

**Neuartige peptidische Ligandenkonjugate
zur Hemmung der pathologischen Aggregation
von Amyloid-beta bei Morbus Alzheimer**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von

Laura Akkari

geb. Krause

aus Dortmund

Fakultät für Chemie der Universität Duisburg-Essen
Organische Chemie

Essen 2017

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2012 bis Juli 2017 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Thomas Schrader am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen, Standort Essen, durchgeführt.

Tag der Disputation: 18.09.2017

Referent:	Prof. Dr. Thomas Schrader
Korreferent:	Prof. Dr.-Ing. Stephan Barcikowski
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. Torsten C. Schmidt

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Neuartige peptidische Ligandenkonjugate zur Hemmung der pathologischen Aggregation von Amyloid-beta bei Morbus Alzheimer“

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe. Die Arbeit wurde in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht.

Essen, 18.07.2017

Laura Akkari

Für meine Familie

Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Schrader für die Möglichkeit, meine Dissertation mit diesem interessanten interdisziplinären Thema in seinem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen. Außerdem danke ich ihm für die vielen Ratschläge und die fachlichen Gespräche während der Durchführung dieser Arbeit.

Prof. Dr.-Ing. Stephan Barcikowski danke ich für die Übernahme des Korreferates, für die hilfreichen Projekttreffen und besonders für die erfolgreiche Kooperation.

Prof. Dr. Torsten C. Schmidt danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ebenfalls möchte ich mich besonders bei Dr. Carmen Streich für die schöne Zusammenarbeit und die vielen produktiven Diskussionen bedanken. Insbesondere war sie für mich natürlich auch der Ansprechpartner in der Kooperation mit der Technischen Chemie. Vielen Dank für die Herstellung, bzw. Charakterisierung der Goldnanopartikel/Konjugate und für die tollen gemeinsamen Ergebnisse aus dieser Kooperation. Ohne dich wären die unzähligen gemeinsamen ELISA-Experimente sicherlich nicht so abwechslungsreich geworden.

Prof. Dr. Carsten Korth und Dr. Andreas Müller-Schiffmann möchte ich für die Durchführung der Zelleexperimente und allgemein für die gelungene Kooperation danken. Auch für die hilfreichen Diskussionen und neuen Ideen bei unseren Projekttreffen danke ich euch sehr.

Für die stetige Hilfsbereitschaft bei Fragen rund um Abeta und ganz allgemein für unsere Kooperation bedanke ich mich herzlich bei Dr. Luitgard Nagel-Steger vom Arbeitskreis Prof. Dr. Dieter Willbold. Für die Hilfestellung und die ersten Durchführungen der DGZ/ELISA-Experimente möchte ich Dr. Christina Decker danken.

Dipl.-Ing. Heinz Bandmann, Dr. Torsten Schaller und Dr. Felix Niemeyer danke ich für die Aufnahmen der NMR-Spektren und für die Diskussionsbereitschaft bei fachlichen und nicht-fachlichen Gesprächen.

Elvan Yilmaz und Dr. Marco Hellmert aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Markus Kaiser danke ich für die Durchführung der LC-MS-Messungen, sowie Dipl.-Ing. Werner Karow und Gudrun Heinrich für die Aufnahmen der Massenspektren.

Heike Wöll danke ich für die Durchführung der analytischen HPLC und Herstellung der Peptide am automatisierten Peptidsynthesizer. Ebenfalls schätze ich sehr, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte. Danke Heike!

Klaus Kowski danke ich für die Unterstützung bei technischen Problemen und den vielen interessanten und informativen Gesprächen außerhalb der Chemie.

Jessica Sabrina Kunter danke ich für die Hilfe bei bürokratischen Problemen und den unzähligen lustigen Momenten während der Mittagspausen.

Prof. Dr. Gebhard Haberhauer möchte ich für die Benutzung des CD-Geräts danken, insbesondere auch Petra Schneider für die Hilfestellung bei den CD-Messungen. Die schönen Gespräche mit euch, Petra Schneider und Helma Kallweit, haben mir häufig wieder Mut und Motivation gegeben. Dafür danke ich euch von Herzen!

Dr. Markus Heidelmann vom ICAN und Dipl.-Ing. Jurij Jakobi aus dem Arbeitskreis Barcikowski danke ich für die Anfertigung der TEM-Aufnahmen.

Max Sena Peters danke ich für die Hilfestellung bei den MD-Simulationen.

Dr. Lisa Gamrad aus dem Arbeitskreis Barcikowski danke ich für die Konfokalmikroskopieaufnahmen am IMCES, Jenny Bormann aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Barbara Saccà für die Anfertigung der AFM-Bilder.

Den Auszubildenden Bianca Münch, Christopher Wißmanns, Alexander Sagert und den Studenten Bertram Hilterhaus, Tanja Kinder, Kyra Kujawski, Derek Koch und Simon Thölke möchte ich für ihre präparative Unterstützung danken.

Ein großer Dank geht an Dr. Marco Hellmert, Dr. Kristoffer Klewe, Jessica Krause und Kyra Kujawski für die kritische und sorgfältige Durchsicht meiner Doktorarbeit.

Des Weiteren möchte ich natürlich dem gesamten Arbeitskreis Schrader für die gemeinsamen Jahre danken: Shubhankar Gadre, Inesa Hadrovic, Christian Heid, Angela Kleinbölting, Klaus Kowski, Kyra Kujawski, Jessica Sabrina Kunter, Dr. Felix Niemeyer, Max Sena Peters, Dr. Jolanta Polkowska, Dr. Torsten Schaller, Daniel Smolin, Andrea Sowislok, Burkhard Wettig, Heike Wöll und Dr. Eva Zeppenfeld.

Besonders bedanke ich mich bei meinen tollen Laborpartnern Dr. Marco Hellmert, Robert Bekus und Catherine Gsell für die schönen Stunden im und außerhalb des Labors.

Dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Haberhauer danke ich für das angenehme Klima und hier besonders Alexandra Janiszewski für die lustigen Zeiten in unseren Pausen.

Meinen Freunden Nina Dähne, Dr. Marco Hellmert, Dr. Kristoffer Klewe, Kyra Kujawski, Rebecca Lesske, Mathias Pilscheur, Julia Soldat, Djamschid Alberto Solouk, Marina Sturm und Derya Ünal danke ich von Herzen. Ohne euch wäre ich nie bis hierhin gekommen. Vielen, vielen Dank für eure Unterstützung!

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Mann Tarek für die Unterstützung, das Verständnis und die Liebe, die ihr mir während der gesamten Zeit immer wieder gezeigt habt.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Mutter für all die Liebe und Zuneigung, die du mir gegeben hast, bedanken. Du hast mir geholfen, meinen Weg zu finden und es vergeht kein Tag, an dem ich nicht an dich denke. Du fehlst...

Teile dieser Arbeit sind publiziert, eingereicht oder auf Kongressen präsentiert worden:

Publikationen:

[1] Streich, C.; Akkari, L.; Decker, D.; Bormann, J.; Rehbock, C.; Müller-Schiffmann, A.; Niemeyer, F. C.; Nagel-Steger, L.; Willbold, D.; Sacca, B.; Korth, C.; Schrader, T.; Barcikowski, S. Characterizing the Effect of Multivalent Conjugates Composed of A β -Specific Ligands and Metal Nanoparticles on Neurotoxic Fibrillar Aggregation, *ACS Nano*, **2016**, *10*, 7582-7597.

Konferenzvorträge (*Vortragender):

[1] Streich, C.*; Krause, L.; Schrader, T., Barcikowski, S. Functionalized gold nanoparticles as analytical tools for protein conformational disorders. 6. NRW Nano-Konferenz- NMWP, Dezember 2014, Dortmund.

[2] Streich, C.*; Akkari, L.; Schrader, T., Barcikowski, S. Plasmonic gold nanoparticles as platform for biomolecules counteracting protein misfolding diseases, CENIDE Nanobiophotonics Symposium 2015, März 2015, Essen.

[3] Streich, C.*; Brungs, D.; Akkari, L.; Schrader, T., Barcikowski, S. Gold nanoparticle functionalization against misfolding of the Alzheimer peptide A β . 15th Conference of the International Association of Colloid and Interface Scientists (IACIS 2015), Mai 2015, Mainz.

[4] Streich, C.*; Akkari, L.; Schrader, T., Barcikowski, S. Functionalized gold nanoparticles inhibit oligomerization of the Alzheimer peptide A β . EuroNanoForum 2015, Juni 2015, Riga (Lettland).

[5] Streich, C.*; Akkari, L.; Schrader, T., Barcikowski, S. The effect of functionalized gold nanoparticles on pathologically aggregating proteins. Latest Advances on Nanomaterials for Biomedical Applications (NANO BIOAPP 2015), September 2015, Barcelona (Spanien).

[6] Streich, C.; Rehbock, C.*; Akkari, L.; Schrader, T., Barcikowski, S. Attenuating the neurotoxic aggregation of the Alzheimer's peptide A β with functionalized gold nanoparticles. SPIE Photonics West, Februar 2016, San Francisco (CA, USA).

[7] Streich, C.*; Rehbock, C.; Akkari, L.; Schrader, T., Barcikowski, S. Counteracting neurotoxic protein aggregation with β -sheet breaking gold nanoparticles. BioNanoMed 2016, April 2016, Krems (Österreich).

[8] Streich, C.*; Rehbock, C.; Akkari, L.; Schrader, T., Barcikowski, S. Detoxifying Protein Aggregates Involved in Alzheimer's Disease with Multivalent Gold Nanoparticles. 7. Junges Chemie Symposium Ruhr, Oktober 2016, Dortmund.

Konferenzposter:

- [1] Akkari, L.; Streich, C.; Decker, C.; Nagel-Steger, L.; Barcikowski, S.; Schrader, T. Inhibition of Amyloid- β Aggregation by Mono-functionalized Gold Nanoparticles. 4th Austrian Peptide Symposium, Dezember 2014, Salzburg.
- [2] Kujawski, K.; Akkari, L.; Streich, C.; Barcikowski, S.; Schrader, T. Design of artificial proteases for immobilization on Au-NPs as therapeutic option for amyloid diseases. German Symposium in Supramolecular Chemistry (SupraChem 2015), Februar 2015, Berlin.
- [3] Streich, C.; Akkari, L.; Schrader, T., Barcikowski, S. Plasmonic gold nanoparticles as platform for biomolecules counteracting protein misfolding diseases. CENIDE Nanobiophotonics Symposium 2015, März 2015, Essen.
- [4] Streich, C.; Akkari, L.; Decker, C.; Nagel-Steger, L.; Schrader, T., Barcikowski, S. Inhibition of Amyloid Beta Aggregation by Functionalized Metal Nanoparticles. 12th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases and Related Neurological Disorders (AD/PD 2015), März 2015, Nizza (Frankreich).
- [5] Streich, C.; Akkari, L.; Schrader, T., Barcikowski, S. Functionalized gold nanoparticles inhibit oligomerization of the Alzheimer peptide A β . European Global Summit for Nanomedicine and Targeted Medicine (CLINAM 2015), Juni 2015, Basel (Schweiz).
- [6] Streich, C.; Rehbock, C.; Akkari, L.; Schrader, T., Barcikowski, S. How gold nanoparticles may counteract protein misfolding on the Alzheimer peptide A β . Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM 2015), November 2015, Freiburg.
- [7] Gamrad, L., Streich, C.; Rehbock, C.; Akkari, L.; Schrader, T., Hansen, W.; Barcikowski, S. Functional laser-generated gold-nano-conjugates for in vitro bioapplications. 4th Conference on Advanced Nanoparticle Generation and Excitation by Laser in Liquids (ANGEL 2016), Mai 2016, Essen.
- [8] Streich, C.; Rehbock, C.; Akkari, L.; Schrader, T., Barcikowski, S. Can amyloid-targeting gold nanoparticles detoxify neurodegenerative protein aggregates involved in Alzheimer's disease? 6th EuCheMS Chemistry Congress, September 2016, Sevilla (Spanien).
- [9] Streich, C.; Rehbock, C.; Akkari, L.; Schrader, T., Barcikowski, S. Gold Nanoparticles-Based Targeting and Detoxification of Amyloid Aggregates Involved in Alzheimer's Disease, 7. NRW Nano-Konferenz – NMWP, Dezember 2016, Münster.

1	Einleitung	1
1.1	Die Alzheimersche Krankheit – Morbus Alzheimer	1
1.1.1	Amyloid- β und APP	4
1.1.2	Fibrillogenese von A β	5
1.1.3	Amyloid-Kaskaden-Hypothese	7
1.2	Therapie- und Strategieansätze	9
1.2.1	Aromatische Verbindungen	12
1.2.2	Peptidische Wirkmoleküle	13
1.2.3	Aminopyrazolliganden	16
1.3	Nanomaterialien	24
1.3.1	Goldnanopartikel	24
1.3.1.1	Chemisch hergestellte Goldnanopartikel	25
1.3.1.2	Lasergenerierte Goldnanopartikel	27
1.3.1.3	Eigenschaften von Goldnanopartikeln	29
1.3.2	Goldnanopartikel in der Medizin	33
2	Aufgabenstellung	36
3	Durchführung und Ergebnisse	41
3.1	Aβ-Erkennungseinheit (Selektoren)	45
3.1.1	Synthese der D3-Derivate	45
3.1.2	Herstellung und Charakterisierung von lasergenerierten Goldnanopartikeln	48
3.1.3	Goldnanopartikel mit D3-Derivaten	51
3.1.4	Wirkung der Au/D3-Derivate auf A β (1-42)	59
3.1.4.1	ThT-Messungen	67
3.1.4.2	CD-Messungen	72
3.1.4.3	Rasterkraftmikroskopie- (AFM) und Transmissionselektronenmikroskopieuntersuchungen (TEM)	79
3.1.4.4	Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) und enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (ELISA)	84
3.1.4.5	Zellkulturassay und Mikroskopie der Zellen	91
3.1.5	Zusammenfassung	97
3.2	β-Faltblattbrecher	100
3.2.1	Synthese der Aminopyrazolderivate	100
3.2.2	Goldnanopartikel mit Aminopyrazolderivaten	103
3.2.3	Wirkung der Au/Trim-Derivate auf A β (1-42)	107

3.2.3.1 ThT-Messungen	109
3.2.3.2 CD-Messungen	112
3.2.3.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)	116
3.2.3.4 Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) und enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (ELISA)	120
3.2.3.5 Zellkulturassay und Mikroskopie der Zellen	121
3.2.4 Zusammenfassung	125
3.3 Bifunktionale Nanopartikelkonjugate	128
3.3.1 Synthese einer Hybridverbindung aus A β -Selektor und β -Faltblattbrecher	128
3.3.2 Wirkung der bifunktionalen Nanopartikel auf A β (1-42)	136
3.3.2.1 ThT-Messungen	137
3.3.2.2 CD-Messungen	139
3.3.2.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)	141
3.3.2.4 Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) und enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (ELISA)	143
3.3.2.5 Zellkulturassay und Mikroskopie der Zellen	145
3.3.3 Zusammenfassung	149
3.3.4 Molekulares Modelling und Synthese eines neuen D3-Peptids	151
3.3.5 Goldnanopartikel mit neuem D3-Derivat D3-(SG)7C	157
3.3.6 Wirkung von Au/D3-(SG)7C auf A β (1-42)	158
3.3.6.1 ThT-Messungen	158
3.3.6.2 CD-Messungen	160
3.3.7 Zusammenfassung	161
4 Zusammenfassung und Ausblick	163
4.1 Zusammenfassung	163
4.2 Ausblick	171
5 Experimenteller Teil	176
5.1 Material und Methoden	176
5.2 Synthese des Trimersäurebausteins	181
5.3 Automatisierte Festphasenpeptidsynthese	201
5.3 Manuelle Festphasenpeptidsynthese	216
5.4 Monomerisierung von A β (1-42)	230
5.5 Goldnanopartikelsynthese mittels Laserablation	230
5.6 Analytische Scheibenzentrifugation	231

5.7 Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zetapotential	231
5.8 Fluoreszenzquenchingexperimente	232
5.9 AFM-Aufnahmen	233
5.10 TEM-Aufnahmen	234
5.11 ThT-Fluoreszenzmessungen	234
5.11.1 Kinetikmessungen von A β (1-42)	234
5.11.2 Inhibierung der Aggregation von 10 μ M A β (1-42) mit 60 μ M Ligand	234
5.11.3 Inhibierung der Aggregation von 10 μ M A β (1-42) mit 0.6 μ M Ligand	236
5.12 CD-Messungen	237
5.13 DGZ/ELISA	238
5.13.1 Dichtegradientenzentrifugation (DGZ)	238
5.13.2 Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (ELISA)	238
5.14 Zellkulturexperimente	239
5.15 Licht- und Konfokalmikroskopie	241
6 Literaturverzeichnis	242

A

A β	Amyloid- β -Peptid
AD	Alzheimer Krankheit, engl. <i>Alzheimer's disease</i>
ADC	Analytische Scheibenzentrifuge, engl. <i>analytical disc centrifuge</i>
AFM	Rasterkraftmikroskopie, engl. <i>atomic force microscopy</i>
AKH	Amyloid-Kaskaden-Hypothese
Ala, A	Alanin
AP	Aminopyrazol
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein, engl. <i>amyloid precursor protein</i>
Arg, R	Arginin
Asn, N	Asparagin
Asp, D	Asparaginsäure, Aspartat
AuNP	Goldnanopartikel
äq	Äquivalent

B

BBB	Blut-Hirn-Schranke, engl. <i>blood-brain barrier</i>
BSA	Bovines Serumalbumin

C

CD	Circulardichroismus
CHO	engl. <i>chinese hamster ovary</i>
Cl-HOBt	6-Chloro-1-hydroxy-1 <i>H</i> -benzotriazol
CM	konditioniertes Medium, engl. <i>conditioned medium</i>
Cys, C	Cystein

D

DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DGZ	Dichtegradientenzentrifugation
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid

DMSO Dimethylsulfoxid

E

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*

ESI Elektrospray-Ionisation

et al. und andere, lat. *et alia*

F

FITC Fluoresceinisothiocyanat

Fmoc Fluorenylmethoxycarbonyl

G

Gln, Q Glutamin

Glu, E Glutaminsäure, Glutamat

Gly, G Glycin

H

HCTU 2-(6-Chlor-1*H*-benztriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat

HFIP 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol

His, H Histidin

HOBt *N*-Hydroxybenzotriazol

HPLC Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. *high performance liquid chromatography*

I

Ile, I Isoleucin

IPD Inter-Partikelabstand, engl. *interparticle distance*

L

Leu, L Leucin

Lys, K Lysin

LiOH Lithiumhydroxid

M

MD	Moleküldynamik
Met, M	Methionin
MS	Massenspektrometrie, engl. <i>mass spectrometry</i>

N

NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz, engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
NP	Nanopartikel

P

p3	Fragment von APP (A β (17-40/42))
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	engl. <i>phosphate buffered saline with TWEEN20</i>
Phe, F	Phenylalanin
PMB	<i>p</i> -Methoxybenzyl
PPI	Primärpartikelindex
Pro, P	Prolin
PtNP	Platinnanopartikel

R

RP-HPLC	engl. <i>reversed phase high performance liquid chromatography</i>
RT	Raumtemperatur

S

scFv	engl. <i>single chain variable fragment</i>
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SPPS	Festphasenpeptidsynthese engl. <i>solid phase peptide synthesis</i>
SPR	engl. <i>surface plasmon resonance</i>

T

TBS	engl. <i>tris-buffered saline</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Thr, T	Threonin
ThT	Thioflavin T
TIS	Triisopropylsilan
TOAB	Tetraoctylammoniumbromid
Trim	Aminopyrazoltrimer
Trt	Trityl
Try, W	Tryptophan
Tyr, Y	Tyrosin

U

UV/Vis	engl. <i>ultraviolet/visible</i>
UZ	Ultrazentrifugation

V

V	Valin
---	-------

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimersche Krankheit – Morbus Alzheimer

Bereits im Jahre 1906 wurden von *Alois Alzheimer* (1864-1915) Symptome einer Krankheit beschrieben, welche heutzutage zu den am häufigsten vorkommenden neurodegenerativen Krankheiten zählt.^[1,2]

In Deutschland sind allein im Jahr 2016 bis zu 1.6 Millionen Menschen an Demenz erkrankt, wovon in etwa zwei Drittel von Alzheimer (*Alzheimer Disease*, AD) betroffen sind. Jedes Jahr gibt es schätzungsweise 300 000 Alzheimer-Neuerkrankungen. Ein wesentlicher Faktor der Alzheimerschen Krankheit ist bekanntlich das Alter.^[3] Der Anteil an älteren Menschen in der Bevölkerung wird in den nächsten Jahren weiter zunehmen, so dass die Krankenzahl, sofern kein Durchbruch in der Forschung und Therapie gelingt, vermutlich bis zum Jahr 2050 allein in Deutschland auf rund 3 Millionen Betroffene steigen wird. Dies bedeutet, dass pro Tag mehr als 100 Personen an Alzheimer erkranken werden.^[4] Weltweit wären 2050 sogar mehr als 106 Millionen Menschen von dieser Krankheit betroffen.^[5]

In **Tab. 1** wird noch einmal deutlich, dass die Prävalenzrate, also der Anteil der an Alzheimer erkrankten Menschen in der Bevölkerung, mit dem Alter stark zunimmt. In der Altersgruppe der 65- bis 69-Jährigen liegt diese noch bei 1.6 %, wohingegen sie bei den Menschen über 90 Jahre auf über 40 % wächst. Zwar steigt die Häufigkeit an Demenzerkrankungen mit dem Lebensalter, jedoch auch die Zahl der Früherkrankungen, d.h. vor dem 65. Lebensjahr zu erkranken, liegt bei rund 20 000 Betroffenen in Deutschland.^[4]

Tab. 1: Prävalenzrate, Inzidenzrate und Neuerkrankungen in Abhängigkeit vom Alter.^[4]

Altersgruppe	Mittlere Prävalenzrate [%]	Jährliche Neuerkrankungswahrscheinlichkeit [%]	Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland (2013)
65-69	1.60	0.53	20 900
70-74	3.50	0.93	39 700
75-79	7.31	1.73	65 900
80-84	15.60	3.20	64 700
85-89	26.11	5.70	61 600
90 und älter	40.95	12.24	49 900

Der Verlauf der Alzheimerschen Krankheit ist noch nicht vollständig erforscht, so dass die Behandlung heutzutage nur rein symptomatisch erfolgen kann. Klinisch wird in drei Phasen unterteilt:

1. Im frühen Stadium der AD erfolgt ein Angriff auf die Neuronen des limbischen Systems, insbesondere die im Hippocampus, dem Gehirnbereich für Erinnerungen. Das Volumen des Hippocampus nimmt in etwa um 25 % ab. Infolgedessen leidet in dieser Phase besonders das Kurzzeitgedächtnis der Patienten. Anfängliche Symptome bei Betroffenen sind unter anderem das Vergessen von Namen oder Ereignissen. Dieses Stadium dauert in etwa zwei bis vier Jahre.
2. Im mittleren Stadium kommt es zu weiteren Schäden im limbischen System. Die Personen verlieren ihr Kurzzeitgedächtnis und haben Schwierigkeiten bei der Kommunikation. Der Alltag der Erkrankten ist nur noch mit Unterstützung zu bewältigen. Es treten Orientierungs- und Konzentrationsstörungen sowie Persönlichkeitsveränderungen auf. Diese Phase kann zwischen zwei und zehn Jahren andauern.
3. In der dritten Phase hat die Krankheit einen großen Teil des limbischen Systems zerstört, einschließlich 90 % des Hippocampus. Nun greift die Krankheit die gesamte Großhirnrinde an, die Patienten vergessen ihre Vergangenheit, ihre Freunde und Familie. Sie sind vollständig von der Betreuung und Pflege anderer abhängig. Diese Phase dauert im Durchschnitt ein bis drei Jahre und endet mit dem Tod des Patienten.^[6]

Nur bei 5 % der Erkrankten ist Alzheimer erblich bedingt, bei 95 % der Patienten tritt die Krankheit sporadisch auf.^[7] Eine eindeutige Diagnose lässt sich nur *post mortem* stellen, indem das Gehirn mikroskopisch untersucht wird und somit charakteristische Veränderungen gefunden werden können.^[8,9]

In **Abb. 1** ist ein Querschnitt durch das menschliche Gehirn dargestellt. Das linke Bild zeigt ein normales gesundes Gehirn, das rechte ein an Alzheimer erkranktes Gehirn. Im fortgeschrittenen Stadium führt der massive Zellverlust zu starken Veränderungen im Gehirn, wodurch es durch die Erkrankung massiv an Substanz verliert.

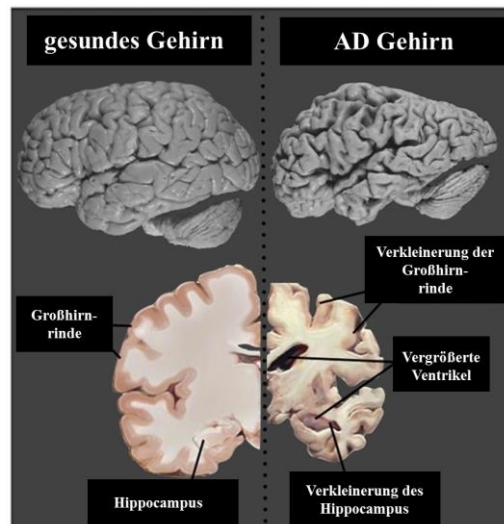


Abb. 1: Darstellung eines gesunden menschlichen Gehirns (links) und eines veränderten, an Alzheimer erkrankten menschlichen Gehirns (rechts).^[10]

Untersuchungen an der Hirnmasse von erkrankten Patienten zeigen intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (engl. *tangles*) und extrazelluläre amyloide Ablagerungen (engl. *plaques*) (**Abb. 2**). Diese intrazellulären *tangles* bestehen aus pathologisch stark phosphoryliertem Tau-Protein, welches die Aufgabe hat, Mikrotubuli Stabilität zu verleihen. Hyperphosphoryliertes Tau dissoziiert von den Mikrotubuli, wodurch diese daraufhin abgebaut werden und sich die Tau-Proteine zu unlöslichen Aggregaten formen können.^[11,12]

Hauptbestandteil der extrazellulären Ablagerungen ist das unlösliche Amyloid- β -Peptid, welches bei der APP-Prozessierung, der Spaltung eines integralen Membranproteins (*Amyloid Precursor Protein*, APP), entsteht.

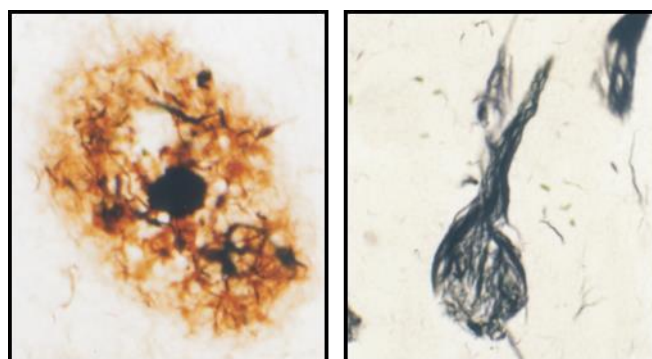


Abb. 2: Gewebeschnitt des Gehirns: amyloide Ablagerungen (links) und neurofibrilläre Bündel (rechts).^[13]

1.1.1 Amyloid- β und APP

Das Amyloid- β -Peptid ($A\beta$) entsteht durch proteolytische Spaltung des *Amyloid Precursor Proteins* (APP). $A\beta$ besitzt eine Größe von ca. 4 kDa und tritt hauptsächlich als Stoffwechselprodukt im menschlichen Körper auf.^[14,15]

APP ist ein Transmembranprotein und spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Gehirns und beim Wachstum von Zellen, allerdings ist die genaue Funktion noch unbekannt.^[16] Es gibt drei wichtige Isoformen von APP (APP₆₉₅, APP₇₅₁, APP₇₇₀), wobei die Isoform APP₆₉₅ die dominierende Isoform darstellt, aus der das Amyloid- β -Peptid gebildet werden kann.^[17] APP₆₉₅ besitzt eine lange extrazelluläre und eine kurze intrazelluläre Domäne. Die Spaltung des Proteins kann mittels der drei unterschiedlichen Proteasen α -, β -, und γ -Sekretase erfolgen. Je nachdem welche Sekretase APP spaltet, wird zwischen einem amyloidogenen und einem nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg unterschieden (**Abb. 3**).^[18–20]

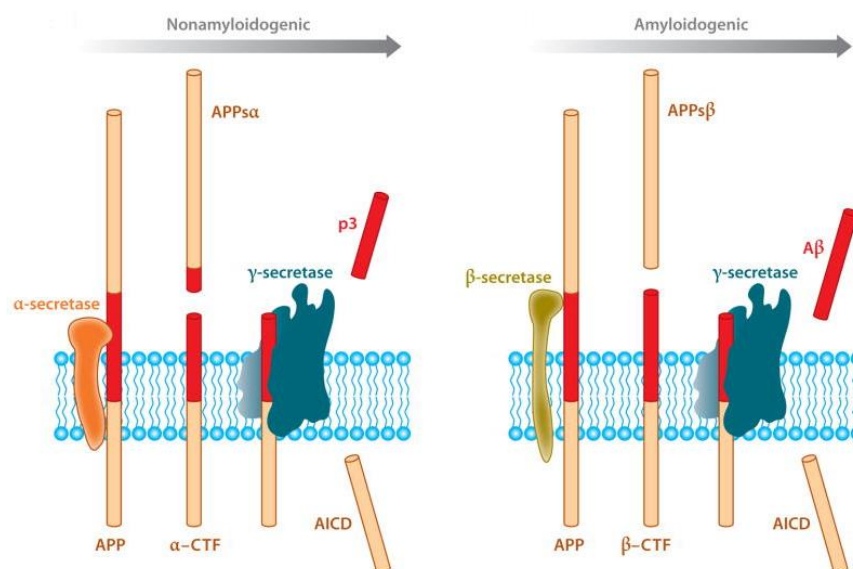


Abb. 3: Übersicht der proteolytischen Spaltung von APP mittels α - und β -Sekretase.^[20]

Bei dem nicht-amyloidogenen Weg entstehen durch Spaltung der α -Sekretase das lösliche N-terminale APPs α -Fragment und das C-terminale α -CTF-Fragment. Das Fragment α -CTF verbleibt in der Membran, wohingegen APPs α in den extrazellulären Raum abgegeben wird. Wird α -CTF weiter durch eine γ -Sekretase gespalten, entsteht das kurze Oligopeptid p3.^[21]

Der amyloidogene Weg startet mit der Spaltung von APP mittels einer β -Sekretase (BACE1), wodurch APPs β (N-terminales Fragment) und β -CTF (C-terminales Fragment) gebildet werden. β -CTF wird, wie auch zuvor α -CTF, durch eine γ -Sekretase geschnitten. Es entstehen

durch diese letzte Spaltung verschiedene Isoformen von A β . Abhängig von der Schnittstelle der γ -Sekretase werden Peptide gebildet, die aus 38 bis 43 Aminosäuren bestehen. A β (1-40), bzw. A β (1-42) sind hierbei die am häufigsten auftretenden Isoformen.^[22] Im Gehirn wird zu 90-95 % die kürzere Isoform (A β (1-40)) gefunden, A β (1-42) liegt hier nur zu 5-10 % vor. Die aus 42 Aminosäuren bestehende Form hat allerdings durch die zusätzlichen zwei Aminosäuren Isoleucin und Alanin einen hydrophoberen Charakter und ist daher auch aggregationsanfälliger als A β (1-40).^[23–26]

A β (1-42) besitzt sechs negativ geladene und drei positiv geladene Aminosäurereste, so dass die Gesamtladung des Peptids bei -3 liegt.^[27]

5 10 15 20 25 30 35 40
DAE**FR** **H****D****S****G****Y** **E****V****H****H****Q** **K****L****V****F****F** **A****E****D****V****G** **S****N****K****G****A** **I****I****G****L****M** **V****G****G****V****V** **I****A**

Abb. 4: Aminosäuresequenz von A β (1-42). AS₁₋₂₇:hydrophile Region, AS₂₈₋₄₂ hydrophobe Region (kationische AS blau, anionische AS rot, hydrophobe Bereiche unterstrichen).^[28]

1.1.2 Fibrillogenese von A β

Als monomere Form kann A β (1-42) in seiner sekundären Struktur sowohl als α -Helix, β -Faltblatt oder *random coil* vorliegen.^[29] Bei der Fibrillogenese ändert sich die Struktur des Monomers von der α -helikalen Form in eine β -faltblattreiche Struktur.^[30]

Bei der Aggregation von A β (1-42) wird eine keimabhängige Polymerisationsreaktion vermutet. In **Abb. 5** wird der Aggregationsprozess schematisch dargestellt.

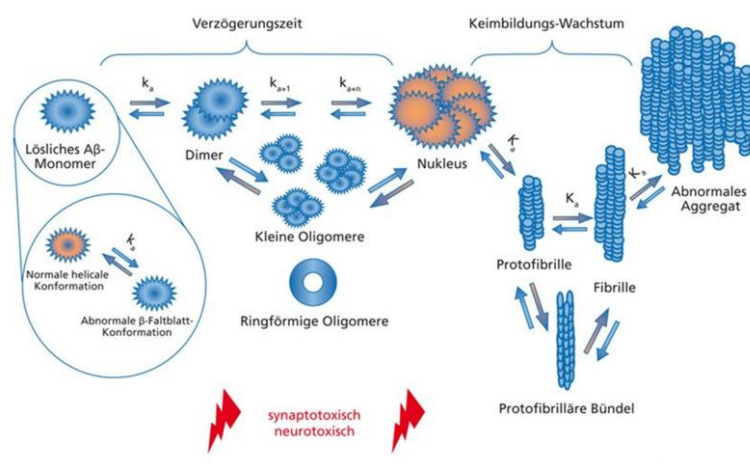


Abb. 5: Schematische Darstellung der A β -Fibrillogenese (abgeändert nach^[31,32]).

Durch die Konformationsänderung der löslichen A β -Monomere von der helikalen in die anormale β -Faltblattstruktur entstehen Dimere, aus denen sich wiederum lösliche Oligomere bilden können. Bei der Verzögerungszeit (engl. *lag phase*) handelt es sich um einen langsamen Keimbildungsprozess, in dem die gebildeten Oligomere als Aggregationskeime (Nukleus, bzw. Nuklei) dienen. Darauf folgend kommt es in der Wachstumsphase der Fibrillen (engl. *seed growth*) zu Protofibrillen und Protofibrillenbündeln, welche sich schlussendlich in Fibrillen und fibrilläre Aggregate umwandeln können.^[33] Dieser gesamte Ablauf ist dynamisch, so dass keine Rückbildung in die jeweiligen Vorstufen erfolgen kann.^[32] Die vermutlich neurotoxischsten Spezies bei diesem Prozess sind allerdings die ringförmigen Oligomere.^[34–36]

Eine detaillierte Übersicht über die Eigenschaften der einzelnen Spezies, die bei der Fibrillogenese entstehen, wird in **Tab. 2** gezeigt:

Tab. 2: Übersicht der A β -Spezies und deren Eigenschaften.^[32]

A β -Spezies	Eigenschaften
Monomere	löslich, amphipatisch; Konformationen: α -helikal, <i>random coil</i> , β -Faltblatt; wird durch APP generiert
Dimere	hydrophober Kern, Durchmesser 35 nm; Vorkommen: intrazellulär <i>in vivo</i> und in menschlichen Gehirnen
Trimere	potentielle Schlüsselrolle als Vorstufe von toxischen Oligomeren; gefunden <i>in vivo</i> in Mausmodellen
Kleine Oligomere	heteromorph, aus 3-50 Monomereinheiten aufgebaut, überwiegend instabil, toxisch; gefunden bei AD-Patienten und in Mausmodellen
Ringförmige Oligomere	potentielle Rolle als membranzerstörende Poren oder Ionenkanäle; gefunden in Zellkulturen
Protofibrillen	kurze, flexible, stabartige Strukturen, max. Größe 8x 200 nm, Vorläufer reifer Fibrillen, toxisch, Vorkommen <i>in vitro</i>
Fibrillen	Stabile, filamentöse A β -Aggregate, bestehend aus sich wiederholenden A β -Einheiten senkrecht zu der Fibrachse, Vorkommen in AD-Patienten und in Mausmodellen
Plaques	lange, extrazelluläre A β -Ablagerungen, vorwiegend aus Fibrillen, nicht toxisch, Vorkommen in AD-Patienten und in Mausmodellen

Durch Festkörper-NMR-Untersuchungen konnte auf die 3D-Struktur der A β -Fibrillen geschlossen werden.^[37] A β (1-42) liegt in einer U-Form vor, welche aus einem β -Strang-Turn- β -Strangmotiv besteht. Dieses Motiv besteht wiederum aus zwei parallelen β -Faltblättern, die durch die Reste 18-26 (β 1) und 31-42 (β 2) gebildet werden. Stabilisiert wird diese Anordnung durch eine Salzbrücke zwischen Asp23 und Lys28 (**Abb. 6**).^[37]

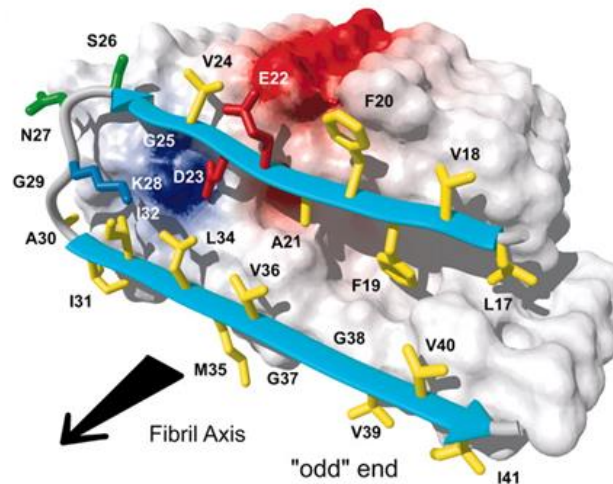


Abb. 6: 3D-Struktur einer Fibrille: β -Faltblattregionen in blau, Sekundärstruktur in grau, hydrophobe AS in gelb, polare AS in grün, negativ geladene AS in rot, positiv geladene AS in dunkelblau. Dargestellte Aminosäuresequenz von Lys17 bis Ile41.^[37]

1.1.3 Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Die Zusammenhänge der Fibrillogenese von A β und der Alzheimerschen Krankheit werden über die Amyloid-Kaskaden-Hypothese (AKH) beschrieben. Diese Hypothese setzt ein Ungleichgewicht zwischen A β -Produktion und A β -Abbau voraus, welches zu einer erhöhten A β -Konzentration und einer vermehrten A β -Ablagerung (*plaques*) im Gehirn führt. Die Ablagerungen führen zu Nervenzellschädigungen, wodurch eine Störung des Stoffwechsels und oxidativer Stress auftreten. Als Folge dessen tritt eine Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins auf, welches sich ebenfalls in Aggregaten anlagern kann. Es kommt zu neuronaler Dysfunktion, Apoptose und dem Verlust der kognitiven Fähigkeiten.^[38,39]

Allerdings konnte in weiteren Studien keine Beziehung zwischen dem Grad der Demenz und der Menge an A β -Ablagerungen im Gehirn gefunden werden.^[40] Heutzutage ist bekannt, dass ein Zusammenhang zwischen den löslichen Oligomeren, welche bereits in niedrigen Konzentrationen neurotoxisch wirken, und dem Demenzzustand der Patienten besteht.^[41-44]

Die ursprüngliche Theorie der Amyloid-Kaskaden-Hypothese ist daher in ihrem Ablauf umstritten. In **Abb. 7** wird der Prozess der klassischen Hypothese und der modifizierten Hypothese gegenübergestellt.

Die Ergebnisse von Experimenten in transgenen Mausmodellen führten zu einer Überarbeitung der AKH. In der neuen Variante wird der intrazellulären Akkumulation von A β -Peptiden mehr Bedeutung als den extrazellulären Ablagerungen geschenkt.^[45]

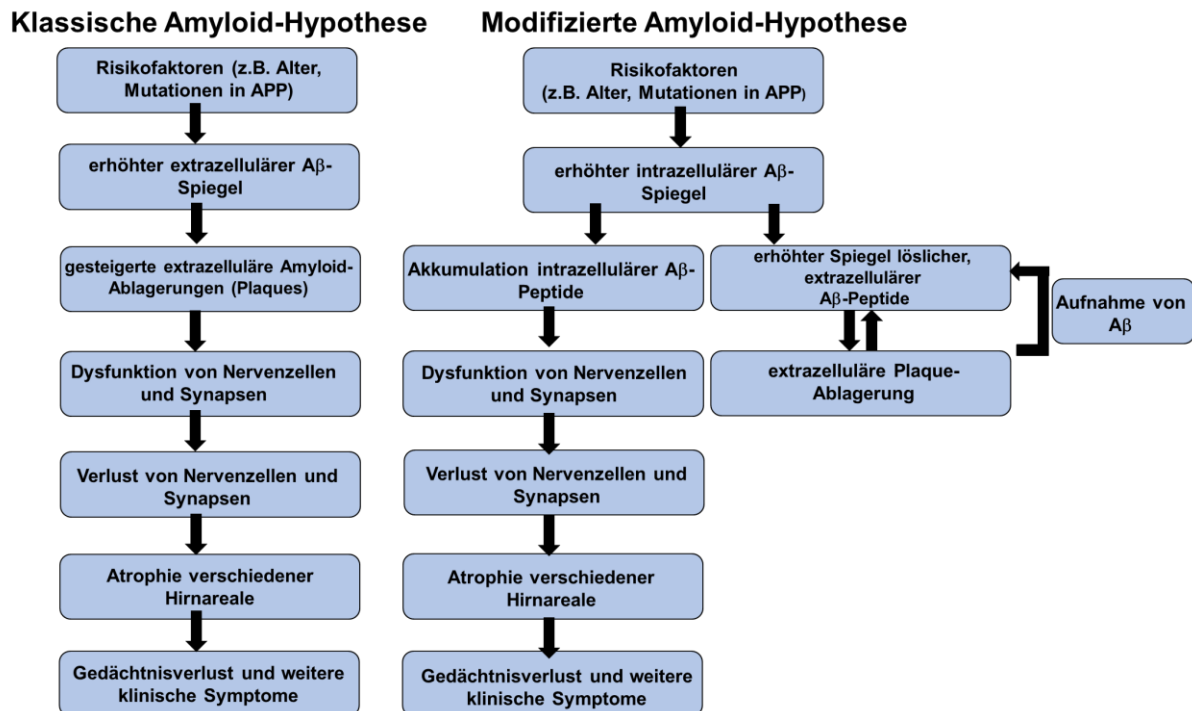


Abb. 7: Vergleich zwischen der klassischen und modifizierten Amyloid-Kaskaden-Hypothese.^[45]

1.2 Therapie- und Strategieansätze

Wie schon zuvor erwähnt, gibt es bis heute keine Behandlungsmethode, welche mehr als eine kurzzeitige Linderung der Symptome bewirkt. Es sind 2016 insgesamt sechs Medikamente von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) zur Behandlung der Symptome von Alzheimer zugelassen worden. Allerdings variiert die Wirksamkeit von Patient zu Patient. In den letzten 15 Jahren wurden über 240 Medikamente getestet, keines unter ihnen konnte effektiv diese Krankheit stoppen.^[46]

In **Abb. 8** wird gezeigt, welche therapeutischen Ansätze bei der Alzheimer-Demenz derzeit erforscht werden.

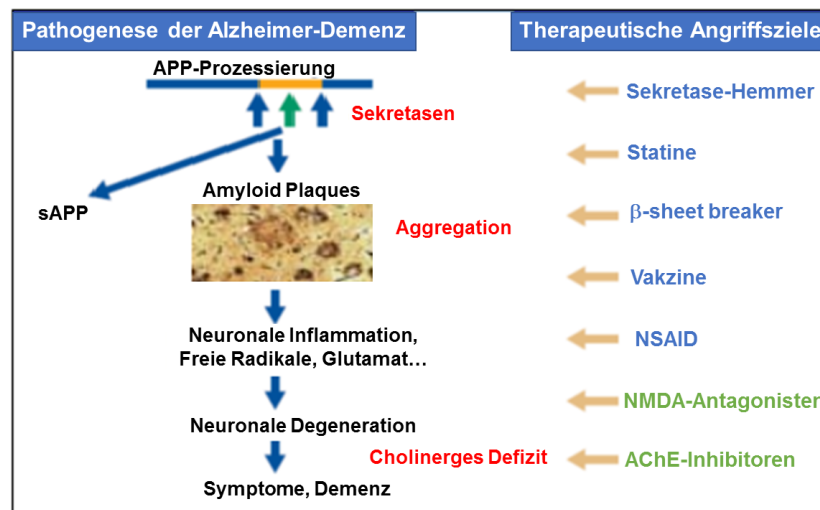


Abb. 8: Therapieansätze bei der Alzheimererkrankung. Bei NMDA-Antagonisten und AChE-Inhibitoren (grün) konnte auch eine antidementive Wirksamkeit und Verträglichkeit belegt werden.^[47]

Es gibt bisher nur zwei Substanzgruppen, bei denen eine Wirksamkeit und Verträglichkeit belegt werden konnte. Die bisher einzigen zugelassenen Medikamente sind die NMDA-Rezeptorantagonisten (Memantine) und die Acetylcholinesterase-Inhibitoren (AChE-Inhibitoren). Beide Therapieansätze wirken erst sehr spät in der Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit, so dass bis dahin schon pathologische Veränderungen aufgetreten sind.^[47]

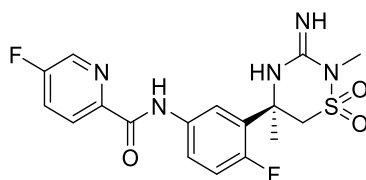
Die Entwicklung eines Impfstoffes (Vakzin) gegen die Alzheimererkrankung könnte ebenfalls erfolgsversprechend sein. So wurde schon 1999 von Schenk *et al.* eine Immunisierung mit humanem A β (1-42) getestet, um damit eine Antikörperbildung gegen A β zu entwickeln.^[48] Allerdings führte dieser Weg bei einigen Patienten zu inflammatorischen Reaktionen (Entzündungen des Gehirns und der Hirnhäute) und damit zum Abbruch dieser Studie.^[49]

Um Alzheimer bei der Entstehung in einem sehr frühen Stadium der Pathogenese zu bekämpfen gibt es weitere therapeutische Ansätze.^[50] Es könnte eine Inhibierung der β - oder γ -Sekretase stattfinden, so dass das *Amyloid Precursor Protein* nicht proteolytisch gespalten wird und kein A β entstehen kann.^[49] Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über den Stand der derzeitigen Forschung (2017) von β - und γ -Sektretaseinhibitoren gezeigt:

1. Inhibitoren der β -Sekretase:

Verubecestat (MK 8931) (**1**) ist ein Wirkstoff bei leichter bis mäßig starker Alzheimer-erkrankung von der Firma *Merck*, welcher seit 2016 in der klinischen Phase III getestet wird.

Das japanische Pharmaunternehmen *Eisai* testet zurzeit einen Wirkstoff namens Elenbecestat (E2609), der sich ebenfalls seit 2016 in ersten Studien von Phase III befindet.^[51]



1

Abb. 9: Struktur des BACE1-Inhibitors Verubecestat (**1**) der Firma *Merck*.^[51]

2. Inhibitoren der γ -Sekretase:

Semagacestat (LY-450139) (**2**) wurde von der Firma *Eli Lilly* entwickelt und erreichte 2010 die klinische Phase III. Allerdings wirkte das Medikament schlechter als die Placebos in der Kontrollgruppe, woraufhin die Untersuchungen gestoppt wurden.

Tarenflurbil (**3**) der Firma *Myriad* ist ein nicht-steroidales Antiphlogistikum (NSAID), bei dem in klinischen Tests gezeigt werden konnte, dass bei Patienten geringere Mengen an A β (1-42), dafür vermehrt die nicht pathogene Variante A β (1-38) gebildet wurde. In Phase III konnte der Wirkstoff allerdings nicht überzeugen.^[52]

Neben der Inhibierung der γ -Sekretase kann auch der Notch-Signalweg, welcher für die Steuerung vieler weiterer Zellprozesse verantwortlich ist, gehemmt werden. Daher besteht bei diesem Therapieweg ein hohes Risiko für diverse Nebenwirkungen.^[53]

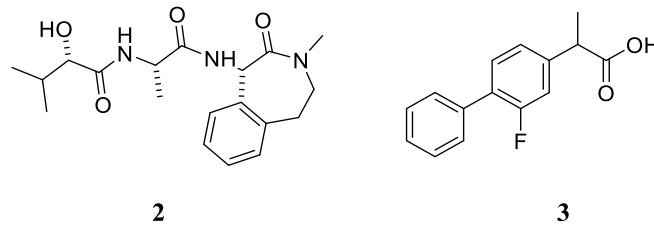


Abb. 10: Struktur der γ -Sekretaseinhibitoren Semagacestat (2) und Tarenflurbil (3).^[54]

Ein anderer Therapieansatz ist die Inhibierung der A β -Aggregation.^[55] Hierbei würde nicht die Bildung des A β -Peptids verhindert werden, sondern es können z.B. kleine Moleküle an A β -Monomere binden, um diese zu stabilisieren und eine Aggregation zu verhindern.^[56]

Ladiwala *et al.* haben aromatische Moleküle anhand ihrer Wechselwirkungen mit A β -Oligomeren in drei Klassen eingeteilt:

Klasse I: aromatische Moleküle, die lösliche Oligomere in große, nicht-toxische Konformere überführen.

Klasse II: aromatische Moleküle, die lösliche Oligomere in Fibrillen umwandeln, jedoch inaktiv gegenüber disaggregiertem und fibrillärem A β sind.

Klasse III: aromatische Moleküle, die lösliche Oligomere und Fibrillen in niedermolekulare, nicht-toxische Spezies umwandeln.^[57]

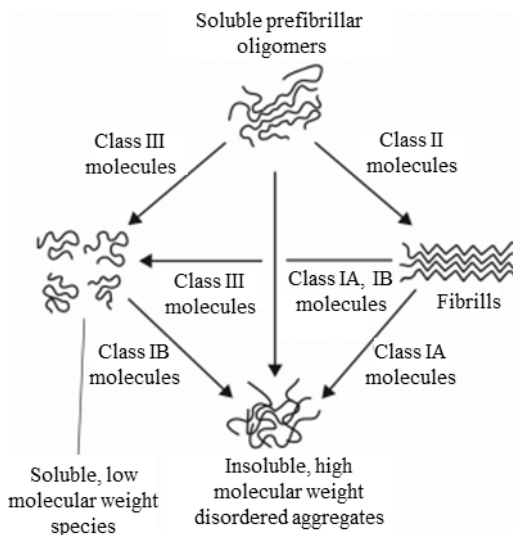


Abb. 11: Übersicht der Wechselwirkungen von aromatischen Molekülen mit löslichen Oligomeren nach Ladiwala *et al.*^[57]

Auch andere Moleküle, wie z.B. Peptide, können nach einem dieser genannten Wirkungswege mit den verschiedenen A β -Formen agieren.

Da das Thema dieser Arbeit unter anderem die Synthese von Molekülen und Peptiden miteinbezieht, welche als β -Faltblattbrecher bzw. als A β -Selektor fungieren, werden in den folgenden Abschnitten unterschiedliche Strategien zur A β -Aggregationsinhibierung im Detail vorgestellt.

1.2.1 Aromatische Verbindungen

Zu den aromatischen Verbindungen, die mit dem A β -Peptid wechselwirken und teilweise die Fibrillogenese hemmen können, zählen unter anderem die nordihydroguaiaretische Säure (NDGA) (4) oder Polyphenole.^[58] Ono *et al.* konnten nachweisen, dass schon sehr geringe Konzentrationen von NDGA die Fibrillenbildung inhibierten, indem sie spezifisch an freies A β binden und die Polymerisation hemmen oder die β -faltblattreiche Konformation destabilisieren konnten.^[59] Tanninsäure besitzt ebenfalls anti-amyloidogene Eigenschaften und kann die A β -Fibrillen *in vitro* destabilisieren.^[60] Weitere aggregationshemmende Polyphenole sind Curcumin und Myricetin.^[61,62]

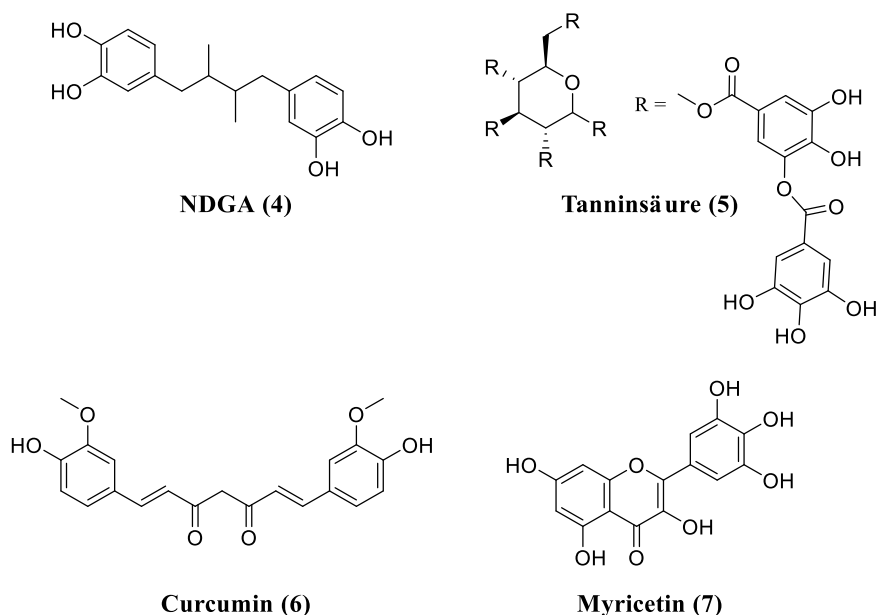


Abb. 12: Strukturen von NDGA (4), Tanninsäure (5), Curcumin (6) und Myricetin (7).

1.2.2 Peptidische Wirkmoleküle

Synthetische Peptide und Antikörper rücken immer stärker als Wirkstoffe gegen eine große Anzahl von Krankheiten in den Fokus der Medizin. Sie werden heutzutage schon unter anderem bei der Linderung von Allergien, Arthritis, Diabetes, Osteoporose, bei Infektionskrankheiten, in der Onkologie und Schmerztherapie, als Impfstoffe und in vielen weiteren Bereichen eingesetzt. Durch ihre hohe Wirksamkeit, niedrige Toxizität und ihre gute Spezifität ist diese Substanzklasse in der Therapie unentbehrlich geworden.^[63] Allerdings müssen Peptide als Wirkstoffe in der Medizin auch bestimmte Voraussetzungen erfüllen: sie müssen proteolysestabil sein und eine ausreichend lange Halbwertszeit besitzen. Um diese Eigenschaften zu erfüllen ist eine rationale Wirkstoffplanung zwingend erforderlich.

Tjernberg *et al.* stellten fest, dass die kurze Aminosäuresequenz KLVFF ($A\beta(16-20)$) ein gesamtes $A\beta$ -Peptid ($A\beta(1-40)$) binden und die Entstehung von Fibrillen verhindern konnte.^[64] Basierend auf diesem Fragment entwickelten Wissenschaftler weitere Strategien zur Verhinderung der Aggregatbildung. Gordon *et al.* blockierten eine Bindungsseite des Pentapeptids durch *N*-Methylierung, so dass keine weiteren Fibrillen mit dem Komplex aus $A\beta(1-42)$ und dem Pentapeptid wechselwirken konnten.^[65]

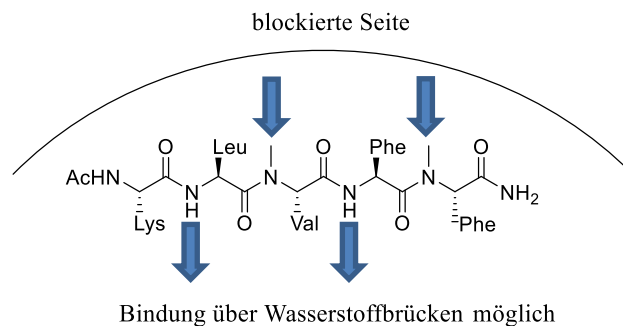


Abb. 13: Struktur des *N*-methylierten KLVFF-Peptids.^[65]

Soto *et al.* synthetisierten ein optimiertes Pentapeptid LVFFA, welches Fibrillen auflösen, die Plaquebildung reduzieren und die Toxizität herabsetzen konnte.^[66]

Da die Variationen möglicher peptidischer Wirkstoffe gegen die Aggregation von $A\beta$ sehr groß sind, wird heute mittels Phagen-Displaytechnik eine Selektion von $A\beta$ -bindenden Peptiden durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden Peptide oder Proteine funktionell auf der äußeren Zellmembran von Bakteriophagen präsentiert, damit anschließend geeignete Bindungspartner identifiziert und isoliert werden können. Eine Weiterentwicklung dieser Methode präsentierten

Schumacher *et al.*^[67] Hierbei wurde ausgenutzt, dass D-Aminosäuren im Gegensatz zu den natürlich vorkommenden enantiomeren L-Aminosäuren proteaseresistent sind und daher eine längere Halbwertszeit besitzen. Bei dieser modifizierten Methode, der sogenannten Spiegelbild-Phagen-Displaytechnik, werden L-Peptide auf der Phagen-Oberfläche präsentiert, die jedoch an das Zielprotein aus D-Aminosäuren binden.

In **Abb. 14** werden die Grundlagen der Phagen-Displaytechnik und der Spiegelbild-Phagen-Displaytechnik schematisch erklärt.

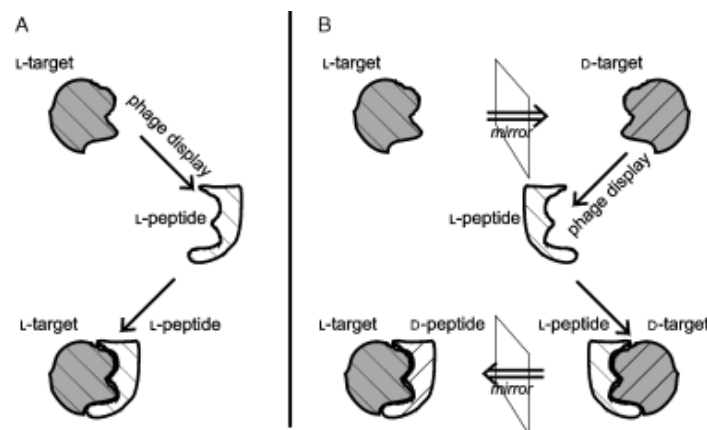


Abb. 14: Bei der Phagen-Displaytechnik binden L-Peptide an das L-Zielmolekül (*target*) (links), es entsteht ein Komplex aus L-Peptiden mit L-Zielmolekülen. Bei der Spiegelbild-Phagen-Displaytechnik wird das Spiegelbild des Zielmoleküls (*target*) eingesetzt, so dass L-Peptide an das D-Zielmolekül binden. Der Komplex wird erneut gespiegelt, es binden D-Peptide an die ursprünglichen L-Zielproteine (rechts).^[68]

Durch die Spiegelbild-Phagen-Displayselektion konnten Willbold *et al.* zwei D-Peptide finden, welche mit hoher Spezifität an A β (1-42) binden konnten. Das D1-Peptid (**8**) ist ein Dodecamer (QSHYRHISPAQV), welches zwar die Plaqueablagerungen reduzieren konnte, sich allerdings nicht als Aggregationshemmer eignete. Eine besondere Eigenschaft des D1 lag darin, dass es in Hirnschnitten ausschließlich A β -Plaques anfärbte, andere Amyloidosen allerdings nicht erkennen konnte. D1 scheint durch seine spezifischen Eigenschaften für die Diagnostik nützlich, jedoch nicht für eine Alzheimertherapie.^[69–71] Das D3-Peptid (**9**) (RPRTLHTHRNR) besteht ebenfalls aus 12 Aminosäuren und hat eine starke Affinität gegenüber niedermolekularen A β -Spezies (1.1 und 0.12 μ M K_D zu zwei Bindungsstellen in A β).^[72] *In vivo* konnte das D3-Peptid Entzündungsprozesse und Ablagerungen verringern.^[73,74]

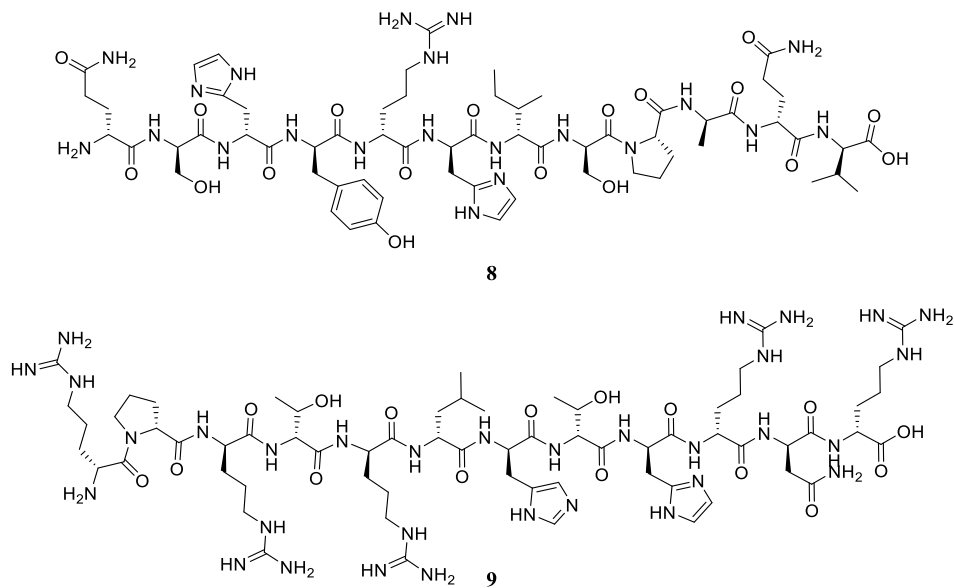


Abb. 15: Strukturen der D-Peptide D1 (8) und D3 (9).

Das Peptid, welches aus einer mehr als eine Milliarde großen Peptidbibliothek selektiert worden ist, zeigte noch weitere Besonderheiten: Es wechselwirkte nicht mit den einzelnen A β -Molekülen, sondern mit den toxischen A β -Oligomeren und wandelte diese in ungiftige Aggregate um.^[73] In der Aminosäuresequenz treten alternierend Arginine an den Positionen 1, 3, 5, 10 und 12 auf, wodurch das Peptid Salzbrücken mit den sauren Aminosäureresten von A β ausbilden konnte.^[75] Der Ligand konnte somit einen A β -D3-Komplex eingehen und beeinflusste folglich das Gleichgewicht bei der Fibrillogenese.

Für den Bereich T R L des D3-Peptids (Aminosäuren 4-6) konnte in der Sekundärstrukturvorhersage eine Tendenz zur β -Faltblattausbildung prognostiziert werden.^[71]



Abb. 16: Aminosäuresequenz von D3 (Arginine in blau, Sekundärstrukturvorhersage zur β -Faltblattkonformation unterstrichen).

1.2.3 Aminopyrazolliganden

Bereits 1996 konnten *Kirsten* und *Schrader* zeigen, dass monomere Aminopyrazole die β -Faltblattkonformation von Dipeptiden intermolekular stabilisierten.^[76,77]

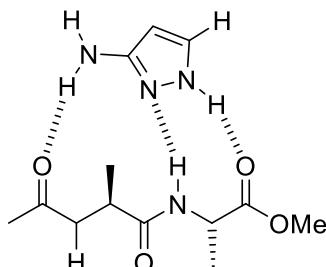


Abb. 17: Schematische Darstellung der Wechselwirkung eines Aminopyrazolmonomers (oben) mit einem Dipeptid (unten) nach *Schrader et al.*^[76,77]

Aminopyrazole stehen im tautomeren Gleichgewicht (1*H*-Pyrazol). Das überwiegend vorliegende 3-Aminopyrazol weist allerdings ein spezielles Bindungsmotiv auf, um fehlgefaltete Peptide, die in ihrer β -Faltblattkonformation vorliegen, ideal komplexieren zu können.^[78–80]

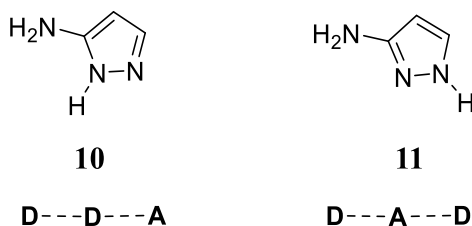


Abb. 18: Strukturen der zwei Aminopyrazolautomere mit ihren jeweiligen Bindungsmotiven.^[81]

Darauffolgend entwickelte die Arbeitsgruppe um *Schrader* weitere β -Faltblattliganden, die selektiv an das A β -Peptid binden konnten. *Rzepecki* untersuchte den Einfluss der Aminopyrazolmonomere und optimierte deren Struktur zu oligomeren Aminopyrazoleinheiten, so dass auch größere Peptide stärker gebunden werden konnten (Abb. 19).^[81]

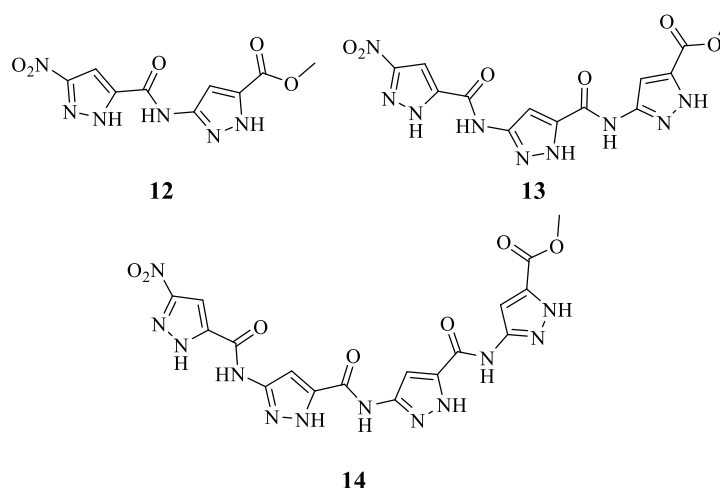


Abb. 19: Strukturen der oligomeren Aminopyrazolderivate nach Rzepecki.^[81]

Als erstes wurden verschiedene Dimere, Trimere und Tetramere aus Aminopyrazoleinheiten hergestellt und untersucht. Da diese Verbindungen allerdings schlecht löslich waren, konnten nur sehr begrenzt Untersuchungen über den Einfluss auf die β -Faltblattstruktur durchgeführt werden. Die Trimerverbindung (**13**) stellte sich als ein sehr guter Inhibitor für A β (1-40) heraus: In *in vitro* Experimenten zeigte sich dieser Ligand sowohl inhibierend als auch disaggregierend gegenüber der A β -Fibrillogenese.^[81,82]

Hochdörffer verfolgte diesen Ansatz weiter und funktionalisierte den Trimerliganden C-terminal mit unterschiedlichsten Resten. Mit biochemischen und biophysikalischen Methoden wurde dann der Einfluss der neuen Liganden auf die Aggregation von A β untersucht. Es konnten Trimerderivate mit folgenden unterschiedlichen funktionellen Gruppen hergestellt werden: mit Carbonsäureester-, Carbonsäure-, und Ammoniumgruppen und auch mit lipophilen und peptidischen Gruppen. Ebenfalls waren die funktionellen Gruppen unterschiedlich weit von den Pyrazoleinheiten entfernt, hierzu dienten z.B. GABA- oder TEG-Spacer.^[83]

Die optimierten Liganden Trimersäure (**15**) und Amino-Trimer (**16**) von Hochdörffer konnten die A β -Aggregation stärker hemmen als der Grundbaustein Trimer (**13**). Beide Liganden lagen unter den verwendeten Versuchsbedingungen in ihrer ionischen Form vor und destabilisierten die β -Faltblattstruktur.^[84]

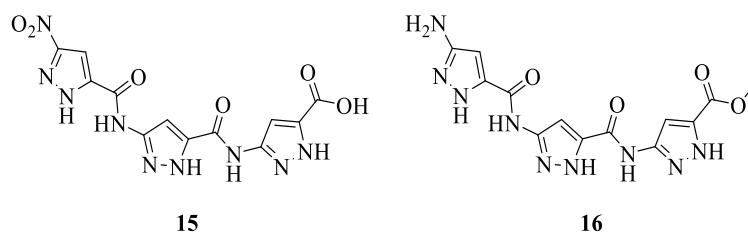


Abb. 20: Strukturen der Liganden Trimersäure (15) und Amino-Trimer (16) nach Hochdörffer.^[83,85]

Mit den beiden neuen Trimerverbindungen wurden zusätzlich Moleküldynamiksimulationen durchgeführt, um mögliche Wechselwirkungen der Derivate mit dem A β -Peptid zu berechnen (Abb. 21).^[83]

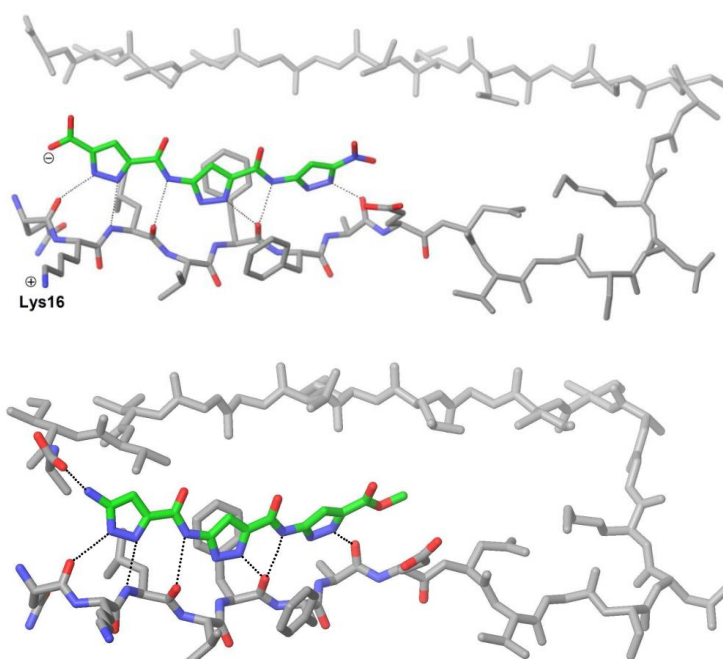


Abb. 21: Minimierte Strukturen zwischen einer Protofibrille und Trimersäure 15 (oben) und Amino-Trimer 16 (unten).^[83]

Als potentester Inhibitor gegen die A β -Fibrillogenese stellte sich ein polykationisches Trimerderivat, Trimer-KKKKKKG (17), heraus. Dieser Ligand war in der Lage zuvor hergestellte Fibrillen wieder aufzulösen und eine deutliche Konformationsänderung des A β -Peptids zu bewirken. Im Gegensatz dazu stabilisierte jedoch ein einzelnes C-terminales Lysin (Trimer-Lysin 18) das A β -Peptid und beschleunigte die A β -Aggregation.^[83]

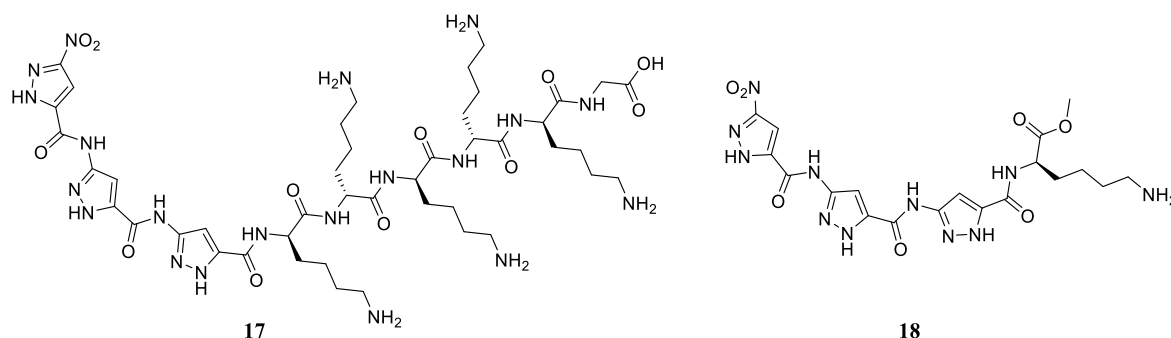


Abb. 22: Strukturen von Trimer-KKKKKG (17) (links), und Trimer-K (18) (rechts).^[83]

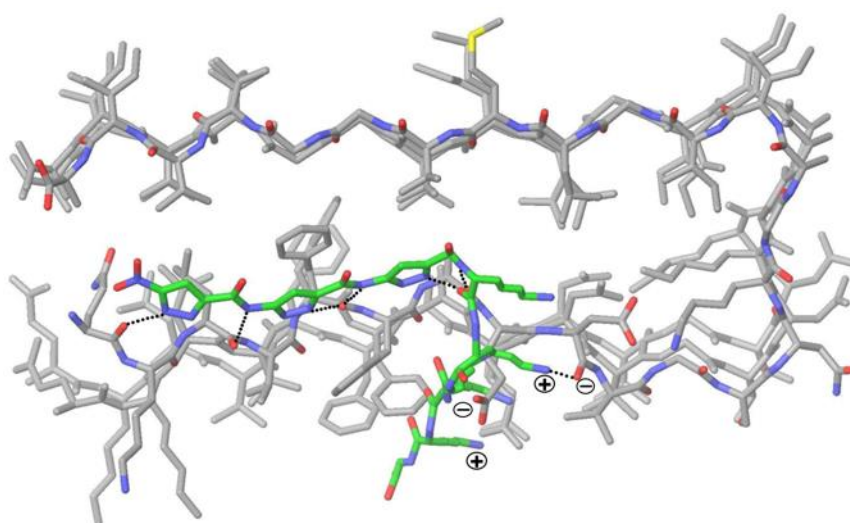


Abb. 23: Energieminimierung zwischen einer pentameren Protofibrille und Trimer-KKKKKG (17).^[83]

Aufbauend auf diesen vielversprechenden Ergebnissen synthetisierte März-Berberich bifunktionale Hybridverbindungen, um die Affinität und auch die Spezifität der Liganden zu verbessern. Mittels Festphasenpeptidsynthese konnte sie Aminopyrazolliganden über verschiedene Linker sowohl mit den Aβ-Selektorpeptiden D1 und D3, als auch mit kleineren Peptideinheiten verknüpfen.

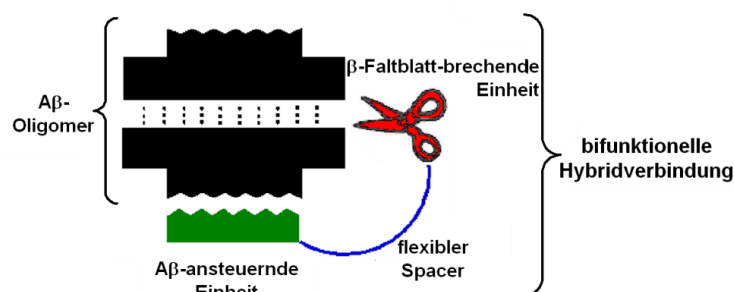


Abb. 24: Konzept der bifunktionalen Hybridverbindungen.^[86,87]

In Funktionalitätstests konnte gezeigt werden, dass die spezifischen Eigenschaften von D1 auch in den Hybridverbindungen auftraten. Das D1-Peptid als Einzelverbindung und in Kombination mit einer Trimereinheit war kein starker Aggregationsinhibitor. Bei den Trimer-D3-Hybridverbindungen konnten allerdings neue Eigenschaften entdeckt werden, die weder die Einzelliganden noch deren Gemische aufwiesen. Trim-TEG-D3 (**21**) konnte eine effektive Unterdrückung der A β -Oligomerbildung bewirken. Ebenfalls stellte sich bei den Untersuchungen heraus, dass die Spacerlänge bei den Trimer-D3-Hybriden deren Wirksamkeit beeinflusste. Die Verbindungen Trimer-GABA-D3 (**20**) und Trimer-D3 (**19**) erwiesen sich als nahezu gleich starke Inhibitoren und reduzierten die Oligomerenbildung sogar bei Verwendung von sehr geringen Ligandenmengen ($c(\text{Ligand}) = 1 \mu\text{M}$).^[87]

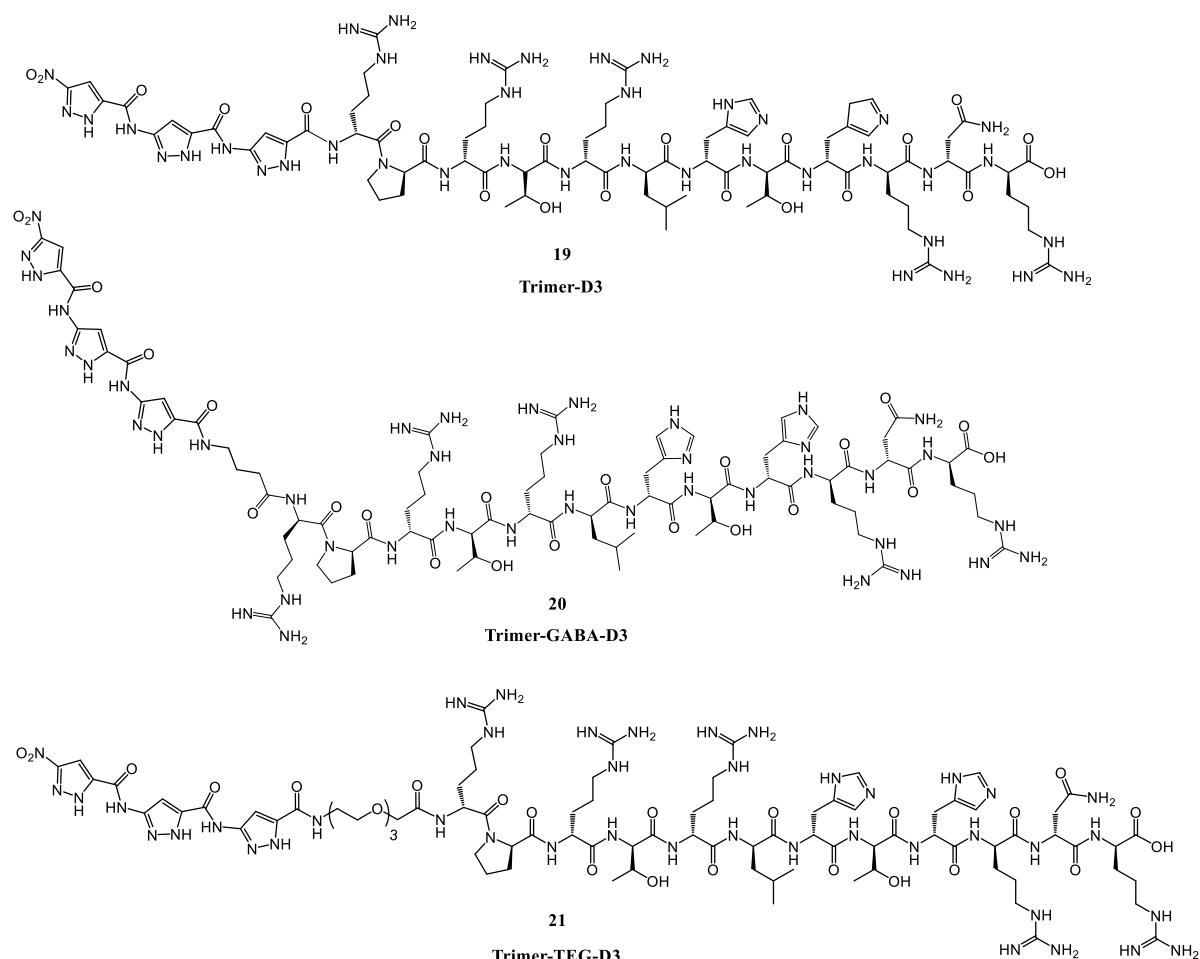


Abb. 25: Strukturen der potentesten Hybridverbindungen Trimer-Spacer-D3 nach März-Berberich.^[86]

Der vermutete Wirkmechanismus dieser Hybride wurde mit DGZ- und TEM-Messungen untersucht: Es konnte eine Erhöhung der A β -Aggregation gezeigt werden, allerdings mit gleichzeitiger Umwandlung von A β -Oligomeren und A β -Protofibrillen in hochmolekulare ungeordnete Formen, die mit den Trimer-D3-Hybriden einen Komplex eingingen.

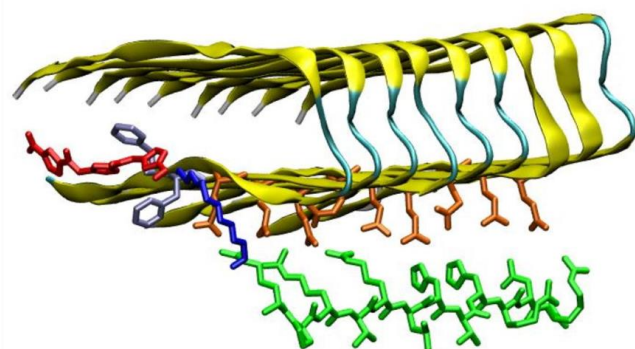


Abb. 26: Modellkomplex aus A β -Nonamer und Trimer-TEG-D3 (**21**) (A β -Bändermodell in gelb, Glu22-Reste in orange, Phe-Reste in violett, Trimer in rot, TEG-Spacer in blau, D3 in grün).^[87]

Mittels Moleküldynamiksimulationen wurde berechnet, dass sich der TEG-Spacer der Trimerderivate in die β -Turn-Region des A β einlagern konnte und diese dadurch destabilisierte. Es wurden weitere Trimerliganden von *März-Berberich* synthetisiert und untersucht. Hierbei waren die Liganden Trimer-TEG-K-OMe (**22**), Trimer-TEG-KKKKKG (**23**) und Trimer-TEG-LPFFD (**24**) von der neuen Trimer-Generation die effizientesten Inhibitoren und sehr starke Aggregationshemmer. Die durchgeführten Experimente bestätigten die vorherigen Berechnungen. Die Verbindungen reduzierten die A β -Toxizität in Zellkulturuntersuchungen, waren selbst jedoch nicht toxisch.^[86,88]

In **Abb. 27** sind die Strukturen der neuen Trimerderivate **22**, **23** und **24** dargestellt.

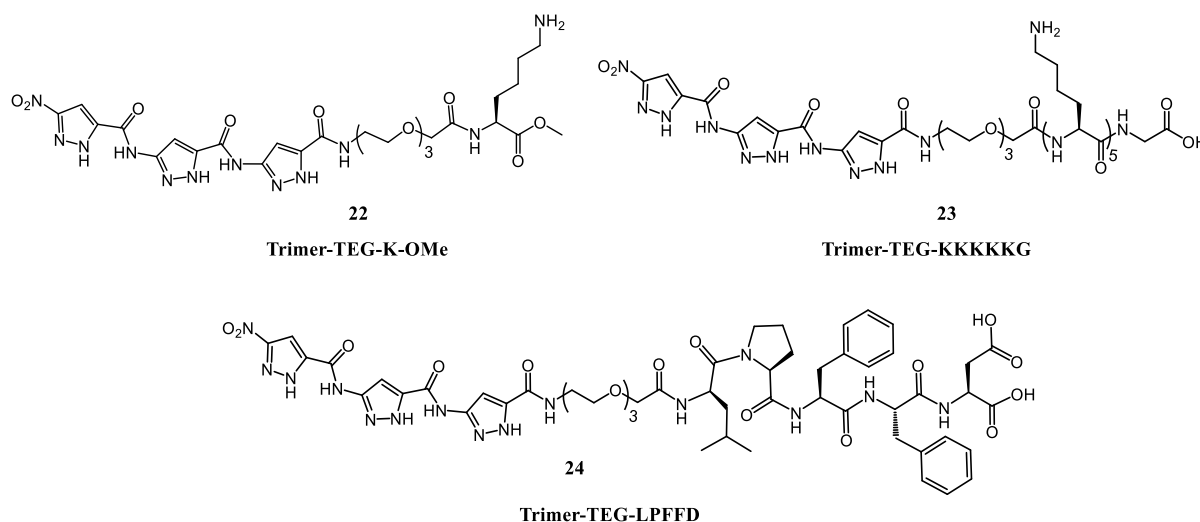


Abb. 27: Strukturen der effektivsten A β -Inhibitoren unter den Trimerderivaten (**22-24**) nach *März-Berberich*.^[86]

Ein weiterer Ansatz war, die bekannten β -Faltblattbrecher mit Antikörpern als Selektoren zu verbinden. Hierbei sollte ein Aminopyrazol an einen IC16-Antikörper oder an sein scFv-Fragment geknüpft werden. Dieser monoklonale Antikörper kann selektiv an die A β -Peptidregion 1-16 erkennen, das A β -bindende Antikörperfragment die Region 1-8.^[89] Da das Fragment wie alle rekombinanten Proteine ein C-terminales Hexahistidinepitop enthält, könnten diese hexahistidin-konjugierten Antikörper über Ni^{2+} -Ionen mit einer Nitrilotriessigsäureeinheit (NTA) komplexiert werden.

Der von März-Berberich synthetisierte Trimer-Spacer-Chelator, Trimer-mono-NTA (**25**), konnte allerdings nicht stark genug an einen Antikörper binden, so dass Hellmert mittels eines Cyclams drei NTA-Gruppen an ein Molekül knüpfte und diese Einheit anschließend über einen Spacer an die Trimerverbindung.^[90]

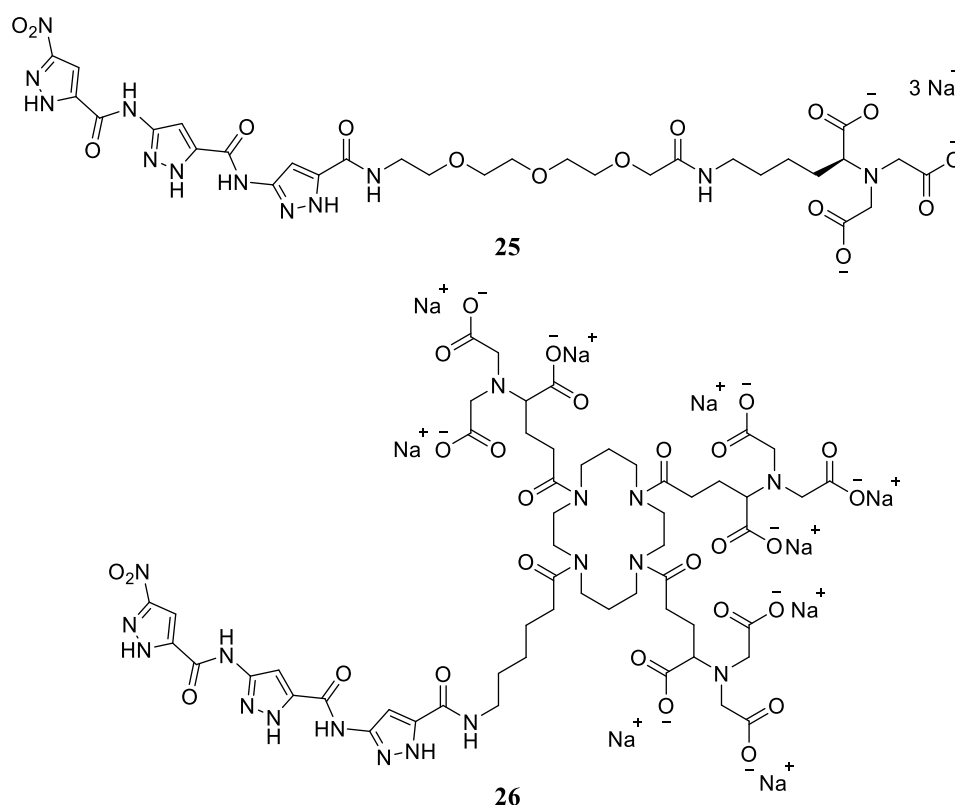


Abb. 28: Struktur von Trimer-mono-NTA (**25**) nach März-Berberich und Trimer-tris(NTA)-Cyclam (**26**) nach Hellmert.^[86,90]

In biologischen Experimenten zeigte der Trimer-Cyclam-tris(Ni^{II} -NTA)-IC16-scFv-Komplex eine sehr große synergistische Bindungsverstärkung zum A β , wobei die einzelnen Komponenten (Cyclam-tris(Ni^{II} -NTA) ohne Aminopyrazol oder Trimer-Cyclam-tris(NTA) ohne Ni^{2+} -Ionen) keinerlei Erhöhung der Bindungsaffinität zeigten.^[80]

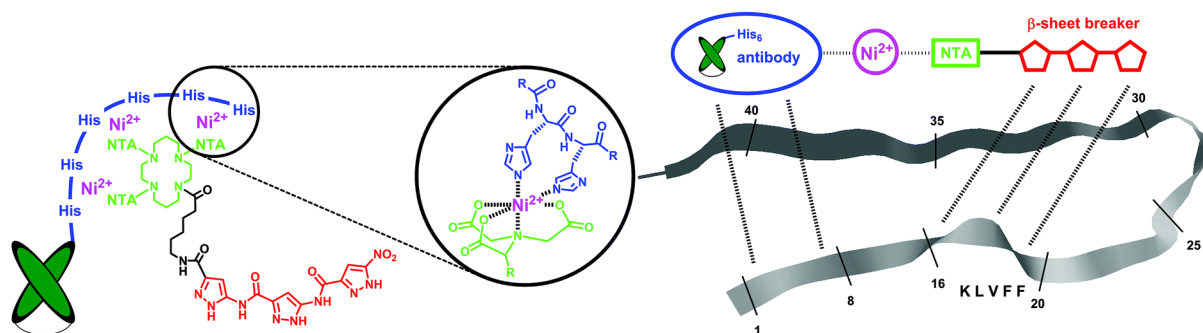


Abb. 29: Schematische Darstellung des Trimer-Cyclam-tris(Ni^{II} -NTA)-IC16-scFv-Komplexes (links). Vermutete Bindungsregionen des Komplexes an ein A β -Monomer: Antikörper erkennt Sequenz 1-8, Trimer 16-20 (rechts).^[80]

Ein weiterer Versuch von *Hellmert* bestand darin, eine künstliche Protease mit einem Aminopyrazol zu verknüpfen. Hierbei würde die Trimereinheit selektiv das A β -Peptid komplexieren und die künstliche Protease das A β -Peptid anschließend hydrolytisch spalten.

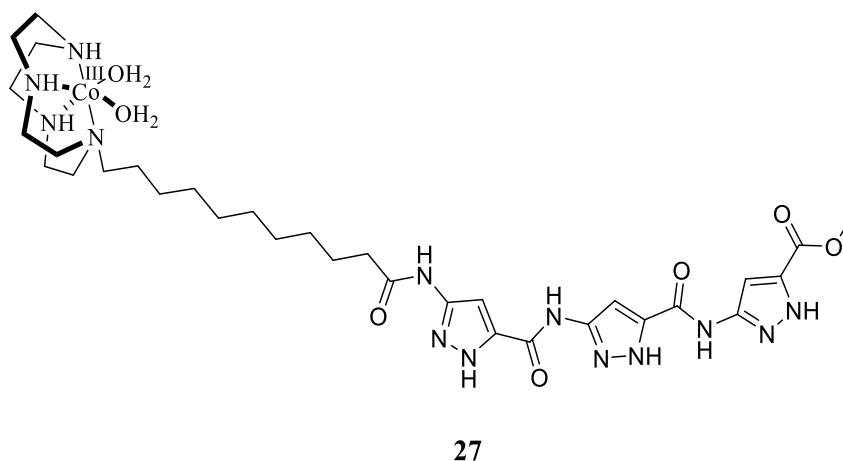


Abb. 30: Struktur des Trimer-Protease-Hybrids **27** nach *Hellmert*.^[90]

Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Komplexes **27** konnten jedoch keine Experimente mit dieser Verbindung durchgeführt werden. Die Proteolysefähigkeit konnte daher nicht weiter untersucht werden.^[90]

1.3 Nanomaterialien

Nanomaterialien werden schon seit längerer Zeit z.B. als Pigmente für Lacke und Kunststoffe, als Nanobeschichtungen in der Automobillackierung oder als Zusatz in Sonnencremes und Make-up eingesetzt.^[91]

Zu dieser Kategorie zählen unter anderem auch die Nanopartikel. Sie besitzen typischerweise eine Größe von 1 bis 100 nm und können aus den unterschiedlichsten Materialien hergestellt werden. Hierfür eignen sich Metall- und Halbmetalloxide, anorganische und organische Materialien wie Polymere und kohlenstoffhaltige Nanopartikel oder auch Metalle wie Gold, Silber und Eisen. Hergestellt werden die meisten Nanopartikel entweder chemisch oder mittels mechanischer Methoden. Sie besitzen ein großes Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis, welches mit kleiner werdendem Partikel weiter zunimmt. Generell unterscheiden sich Nanopartikel stark von ihren makroskopischen Feststoffen.^[92,93]

1.3.1 Goldnanopartikel

Edelmetalle wie Gold oder Silber sind aufgrund ihrer Eigenschaften sehr interessant für die Wissenschaft. Besonders Goldnanopartikel (AuNP) finden seit Jahren immer mehr Verwendung in der Forschung. Die Zahl der Publikationen mit dem Thema „*gold nanoparticles*“ stieg in den Jahren von 1990-2015 von ein bis zwei Veröffentlichungen auf über 10 000 Veröffentlichungen pro Jahr (**Abb. 31**).

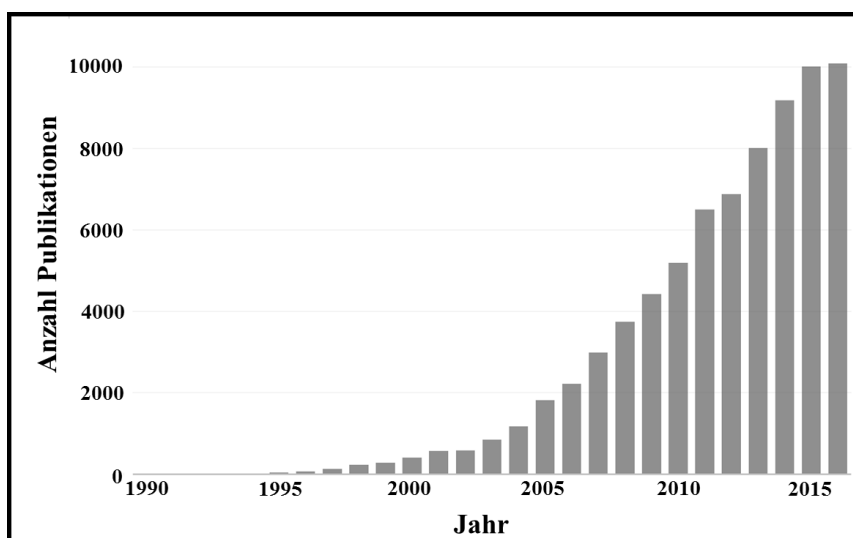


Abb. 31: Anzahl der Publikationen zum Thema „*gold nanoparticles*“ seit 1990. Quelle: *Web of Knowledge*.^[94]

Um Goldnanopartikel zu generieren gibt es zwei grundlegende Möglichkeiten (**Abb. 32**). Eine Methode zur Herstellung von Nanopartikeln ist das „*top down*“-Verfahren, bei dem das Ausgangsmaterial zerkleinert wird. Unter anderem werden das Mahlen von Mikropartikeln und die Nanopartikelherstellung durch Einsatz eines Lasers zu dieser Methode gezählt.

Das zweite Verfahren wird „*bottom up*“ genannt, bei dem kleinere Moleküle oder Atome durch Zusammenlagerung zu Nanopartikeln aufgebaut werden. Hierbei bilden sich zuerst kleine Kristallisationskeime, welche im weiteren Verlauf bis zu einer gewissen Dimension heranwachsen. Durch einen Inhibitor, der an der Nanopartikeloberfläche adsorbiert, kann das Wachstum gestoppt werden. Dieses Verfahren wird bei der Herstellung von chemisch generierten Goldnanopartikeln eingesetzt.

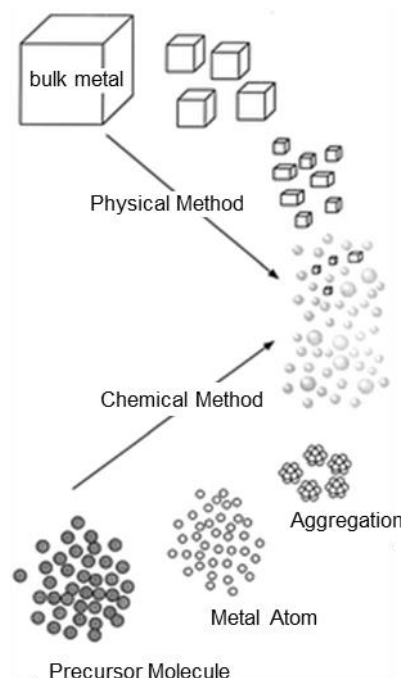


Abb. 32: Darstellung der beiden Verfahren *top down* (physikalische Methode) und *bottom up* (chemische Methode) zur Herstellung von Nanopartikeln.^[95]

1.3.1.1 Chemisch hergestellte Goldnanopartikel

Die bekannteste Methode zur Synthese von Goldnanopartikeln ist die chemische Reduktion. Schon 1857 synthetisierte Michael Faraday durch Reduktion von Tetrachloraurat mittels Phosphor kolloidales Gold und untersuchte dessen Wechselwirkungen mit Licht. Die Reduktion wurde in wässrigem Medium durchgeführt. Es entstand eine rote Flüssigkeit, die eine Trübung bei direkter Sonnenlichteinstrahlung aufwies. Er konnte dadurch beweisen, dass es sich nicht um eine homogene Lösung, sondern um sehr feine dispergierte Goldpartikel handelte.^[96]

Turkevich *et al.* entwickelten 1951 einen Syntheseweg zur Herstellung von Goldnanopartikeln mit Hilfe einer Citratreduktion. Hierbei wurde eine Reduktion von Tetrachlorogoldsäure (HAuCl_4) durch Natriumcitrat in wässrigem Medium durchgeführt. Das Citrat diente in diesem Fall sowohl als Reduktionsmittel als auch als Stabilisator der Goldnanopartikel.^[97,98]

Frens konnte die Reaktion 1973 optimieren. Er steuerte die Größe der Goldnanopartikel durch unterschiedliche Verhältnisse des Au-Salzes zum Citrat, so dass Nanopartikel zwischen 2.5 nm und einigen 100 nm hergestellt werden konnten. Je weniger Citrat eingesetzt wurde, desto größere Partikel entstanden.^[99]

1994 publizierte Brust *et al.* eine Synthese von Goldpartikeln, die durch Reduktion von Tetrachlorogoldsäure mit Natriumborhydrid und mit Hilfe eines Phasentransferkatalysators erfolgte. Als erstes wurde das Goldsalz aus der wässrigen Phase in ein organisches Lösungsmittel (Toluol) mittels Phasentransfer (TOAB) überführt, zu dieser Lösung wurde dann ein organisches Thiol hinzugesetzt. Als letztes wurde ein Überschuss eines starken Reduktionsmittels wie Natriumborhydrid zu der Lösung gegeben, so dass thiolgeschützte Nanopartikel (5-6 nm) entstehen konnten. Diese Partikel wurden durch *n*-Alkanthiole luft- und wärmestabilisiert und wiesen keine Aggregationsneigung auf.^[100,101]

In **Abb. 33** werden die verschiedenen Verfahren zur chemischen Herstellung von Goldnanopartikeln skizziert.

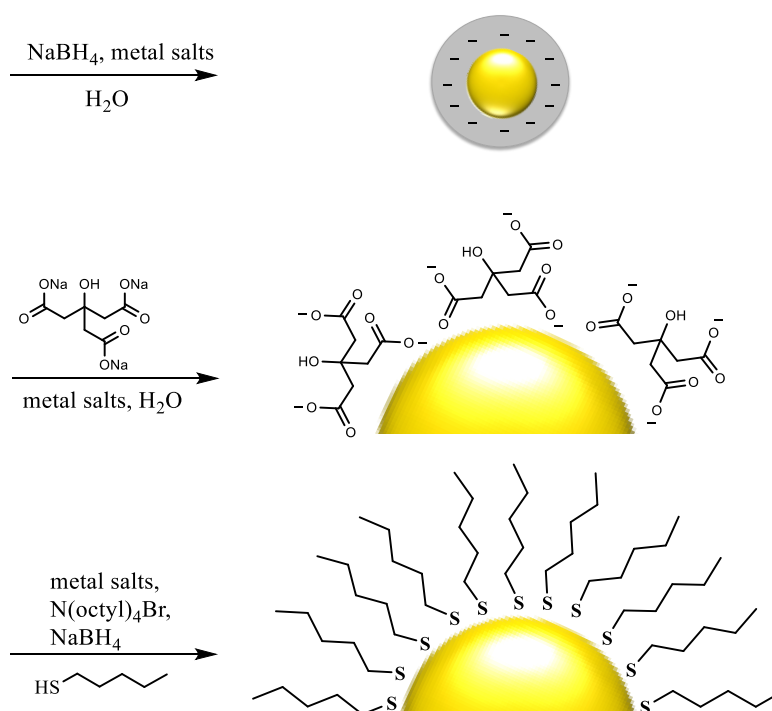


Abb. 33: Darstellung der Verfahren zur chemischen Herstellung von Goldnanopartikeln. Allgemeine Reduktion von Metallsalzen (oben), Reduktion nach *Turkevich* (Mitte), Reduktion nach der *Brust-Schifffrin-Methode* (unten).^[102]

Die Größe von chemisch hergestellten Nanopartikeln ist abhängig von vielen Parametern. Sowohl die Heizzeit, die Temperatur, die Konzentrationen der Edukte, das verwendete Lösungsmittel und der pH-Wert spielen hierbei jeweils eine entscheidende Rolle. Die Größe der Nanopartikel kann somit durch die eingesetzten Reaktionsbedingungen gesteuert werden (**Abb. 34**).

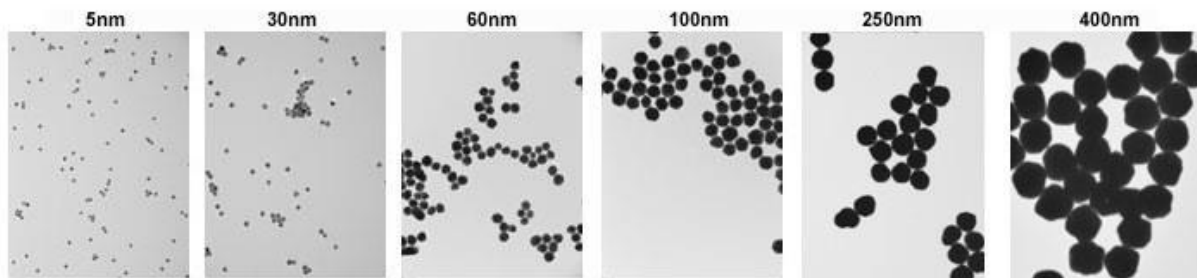


Abb. 34: TEM-Aufnahmen von chemisch hergestellten Goldnanopartikel unterschiedlicher Größe.^[103]

Ebenfalls kann die Partikelform durch Variationen in den Reaktionsbedingungen beeinflusst werden.^[104] In **Abb. 35** sind TEM-Bilder verschiedener Nanopartikel zur Darstellung der unterschiedlichsten Goldnanopartikelformen abgebildet.

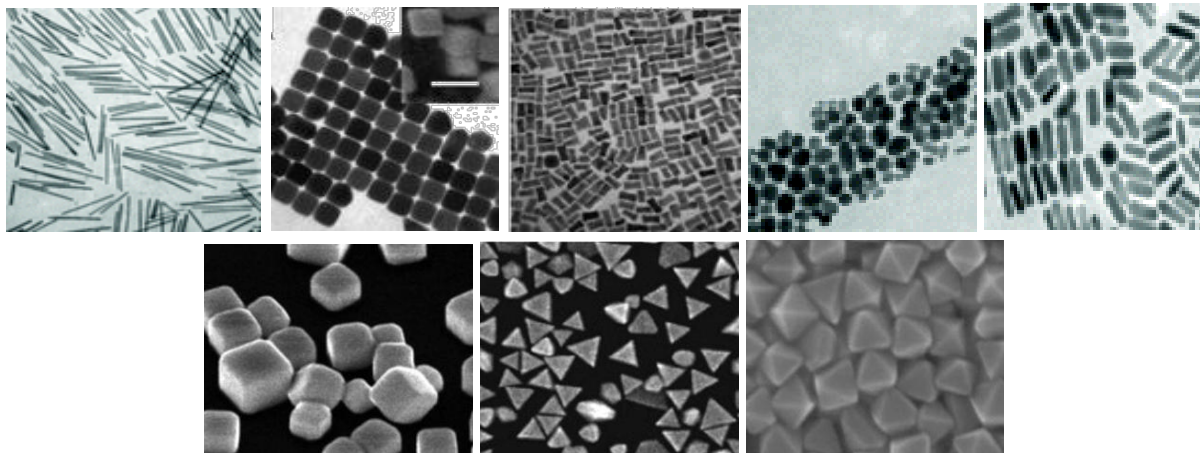


Abb. 35: TEM-Aufnahmen von unterschiedlichen Goldnanopartikelstrukturen.^[104,105]

1.3.1.2 Lasergenerierte Goldnanopartikel

Ein anderes Verfahren zur Generierung von Goldnanopartikeln ist, wie zuvor erwähnt, das „*top down*“-Verfahren. Die Herstellung durch Laserablation in Flüssigkeiten ist eine Möglichkeit Nanopartikel zu synthetisieren.^[106,107] Hierbei wird die Energie eines Lasers auf ein Trägermaterial (*target*) in Lösung gelenkt. Das Material, aus dem die Nanopartikel hergestellt werden sollen, kann so direkt abgetragen werden.

Die gepulsten Laser werden bei einer Wellenlänge von 266 bis 1064 nm auf das Material fokussiert, dieses verdampft und rekondensiert unter der Bildung von Nanopartikeln. Es entsteht eine Dispersion aus dem verwendeten Lösungsmittel und den hergestellten Nanopartikeln.^[108]

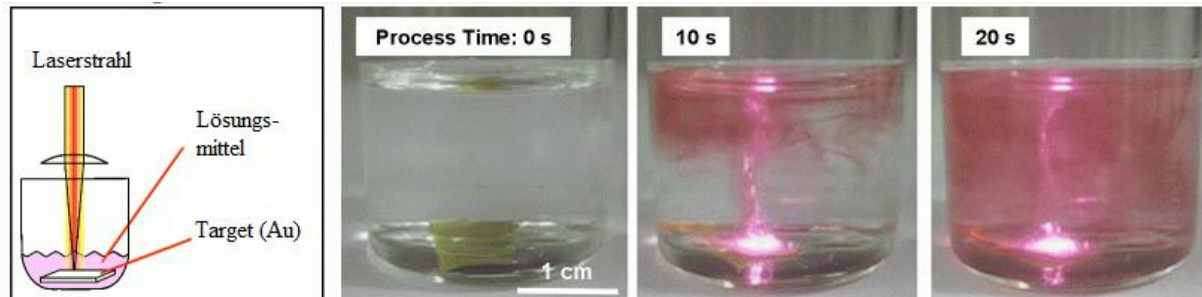


Abb. 36: Produktion von Goldnanopartikeln mittels Laserablation in wässriger Lösung.^[109]

Ein großer Vorteil der Laserablation gegenüber der chemischen Herstellung von Goldnanopartikeln liegt darin, dass keinerlei Stabilisatoren, die meist toxische Eigenschaften aufweisen, eingesetzt werden müssen.^[110,111] Ebenfalls können nahezu jegliche Ausgangsmaterialien (z.B. Metalle, Halbleiter, Oxide, Keramik, Polymere, Legierungen) verwendet und die Synthese sowohl in Wasser als auch in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden.^[107] Das eingesetzte Lösungsmittel kann jedoch einen Einfluss auf die Größe und Form der Nanopartikel nehmen.^[112]

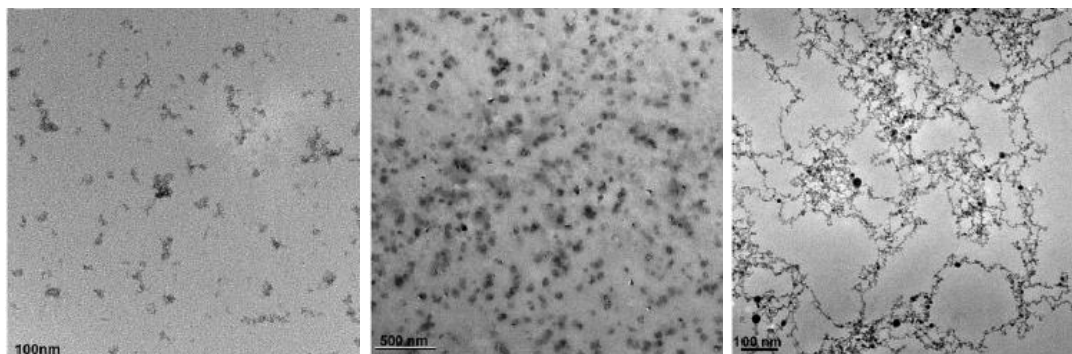


Abb. 37: TEM-Aufnahmen von lasergenerierten Nanopartikeln in Ethanol (links), entionisiertem Wasser (Mitte), Aceton (rechts).^[112]

Allerdings werden bei diesem Verfahren allgemein relativ geringe Mengen und eine vergleichsweise breite Partikelgrößenverteilung der Nanopartikel produziert. Zusätzlich ist ein weiterer Nachteil von lasergenerierten Nanopartikeln in Lösung, dass sie recht instabil sind sobald andere Substanzen (Analytmoleküle) hinzugefügt werden.^[107,113]

Um monodisperse Nanopartikel zu erhalten, können die Partikel allerdings durch Zentrifugation nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

1.3.1.3 Eigenschaften von Goldnanopartikeln

Goldnanopartikel besitzen einige Vorteile: Sie sind unter anderem biokompatibel, inert und mittels mikroskopischer und spektroskopischer Methoden leicht detektierbar.^[114] Nanopartikel in Lösung können durch elektrostatische oder sterische Wechselwirkungen stabilisiert werden. Die elektrostatische Stabilität wird durch eine elektrische Doppelschicht der Nanopartikeloberfläche erzeugt, durch die sich die Partikel gegenseitig abstoßen. Sobald weitere Substanzen hinzugegeben werden, wird diese Doppelschicht verändert und die Nanopartikel können aggregieren.^[113] Die sterische Stabilität von Partikeln wird durch geeignete Liganden hergestellt, die an der Oberfläche adsorbieren. Sobald zwei Nanopartikel sich annähern, schützt diese Ligandenschicht die Partikel und verhindert deren Aggregation (**Abb. 38**).

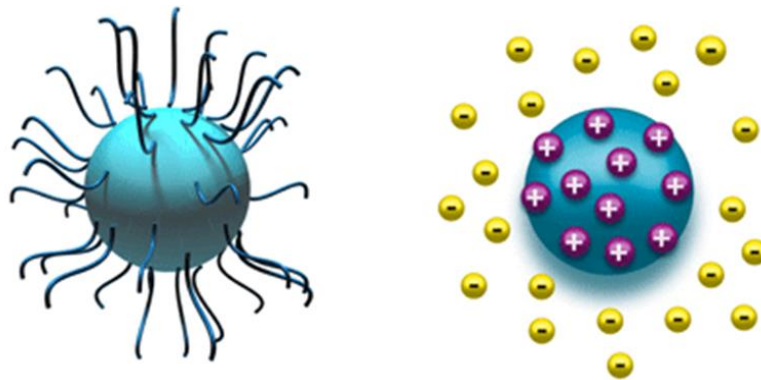


Abb. 38: Schematische Darstellung der Stabilisierung von Nanopartikeln durch sterische (links) oder elektrostatische Stabilisierung (rechts).^[115]

Nanopartikel sind durch ihre Oberfläche oder durch Liganden, die auf die Oberfläche immobilisiert werden, entsprechend geladen. Zur Bestimmung dieser Oberflächenladung kann das elektrische Potential (Zetapotential) gemessen werden.^[116] In einem angelegten geladenen Feld können sich die Nanopartikel entsprechend ihrer Gesamtladung zu der Elektrode mit der umgekehrten Ladung bewegen. Die Wanderungsgeschwindigkeit zu der Elektrode ist hierbei ein Maß für das Zetapotential. Die Stabilität der Nanopartikel kann anhand der Höhe des Zetapotentials bestimmt werden. Allgemein gelten Nanopartikel ab einem Zetapotentialwert von ± 40 mV als langzeitstabil (**Abb. 39**).^[117,118]

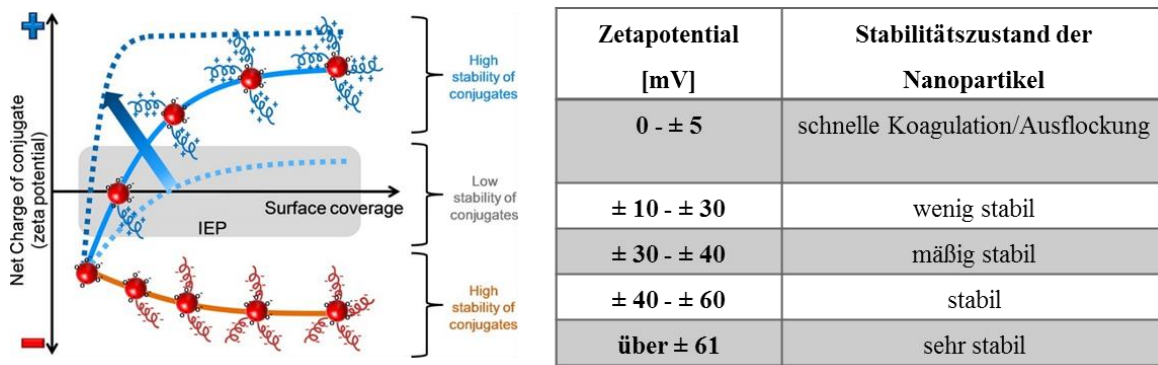


Abb. 39: Ladung und Stabilität von Nanopartikelkonjugaten und deren Zetapotential in einem Diagramm dargestellt (links), tabellarische Übersicht der Nanopartikelzustände abhängig vom Zetapotential (rechts).^[119,120]

Sylvestre *et al.* zeigten, dass die Oberfläche von lasergenerierten Goldnanopartikeln aufgrund von angelagerten Anionen aus dem Lösungsmittel (Sauerstoff- und Carbonationen) negativ geladen ist und die Oberflächenatome teilweise zu Au-O^- oxidieren.^[121]

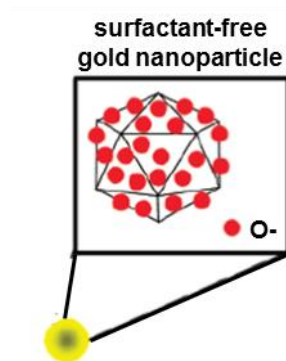


Abb. 40: Schematische Darstellung der Oberflächenatome von lasergenerierten Goldnanopartikeln (liegen teilweise oxidiert vor ($\text{Au}^+/\text{Au}^{3+}$)).^[122]

Durch die negative Ladung besitzen die Partikel ein hohes negatives Zetapotential, wodurch sie elektrostatisch stabil sind und eine hohe Affinität zu weichen Lewis-Basen aufweisen. Verbindungen, die als Elektronendonatoren fungieren, wie z.B. Liganden mit Thiol-, Amino- oder Carbonsäuregruppen lagern sich bevorzugt auf der Oberfläche an.^[122,123] Kovalente Gold-Thiolatbindungen ($-\text{SH}$ oder S-S) gehen dabei mit 184 kJ/mol die stärksten Bindungen ein.^[124]

Chemisch hergestellte Nanopartikel sind hingegen nicht ligandenfrei. Es können an der Partikeloberfläche jedoch vollständige und partielle Ligandenaustauschreaktionen stattfinden, um die gewünschten Konjugate zu erhalten.^[125] Bei diesen Reaktionen werden die vorhergehenden Liganden von der Oberfläche durch die Zielliganden über einen S_N2 -artigen assoziativen Mechanismus verdrängt.^[126,127] Nach der Reaktion muss eine Aufreinigung der Konjugate erfolgen, um so überschüssige Liganden und zuvor immobilisierte Liganden abzutrennen.^[128] Park *et al.* konnten allerdings feststellen, dass der Ligandenaustausch von Citrat durch andere thiol-funktionalisierte Liganden unvollständig verlaufen kann und somit Reste von Citrat auf der Partikeloberfläche verbleiben.^[129]

Durch die Ladung der Nanopartikeloberfläche bzw. durch die Immobilisierung von Liganden auf den Partikeln ändert sich auch die Toxizität der Nanopartikel.^[130,131]

In vitro wurden bisher in vielen Arbeitsgruppen unterschiedliche Zelllinien und Inkubationszeiten bei Toxizitätsuntersuchungen verwendet, wodurch der Vergleich der Resultate nicht eindeutig ist.^[114] Eine Tendenz der *in vitro* Zytotoxizität von Nanopartikeln konnte von Lewinski *et al.* 2008 zusammenfassend publiziert werden:^[132]

- kationische Nanopartikel sind i.d.R. toxischer als anionische Partikel, da sie besser mit der negativ geladenen Zellmembran wechselwirken können^[133]
- Nanopartikel zwischen 1 und 2 nm sind besonders toxisch, 15 nm große Partikel zeigten hingegen auch bei hoher Konzentration keine Toxizität^[134]
- eine Oberflächenfunktionalisierung der Nanopartikel durch Liganden kann einen großen Einfluss auf die Toxizität haben (immobilisierte Liganden/Verunreinigungen können toxisch sein)
- kurzzeitige Exposition von niedrigen Nanopartikelkonzentrationen ($< 10 \mu\text{g/mL}$) sind im Allgemeinen nicht zytotoxisch

Semmler-Behnke *et al.* konnten in ihren *in vivo* Untersuchungen ebenfalls bestätigen, dass 1.4 nm kleine Goldnanopartikel und 18 nm große Partikel eine sehr unterschiedliche Biodistribution aufweisen und somit auch die Größe der Nanopartikel eine entscheidende Rolle spielt.^[135]

Goldnanopartikel in Lösung weisen ein Farbspektrum auf, welches sich von rot über blau nach gelb bis farblos erstreckt. Sobald Licht einer bestimmten Wellenlänge auf die Goldpartikel fällt, werden die Leitungselektronen des Partikels zu einer oszillierenden Schwingung angeregt. Die Frequenz hängt hier von der Form und Größe der Partikel ab, das Licht wird absorbiert und es zeigt sich im Absorptionsspektrum eine Plasmonenbande.

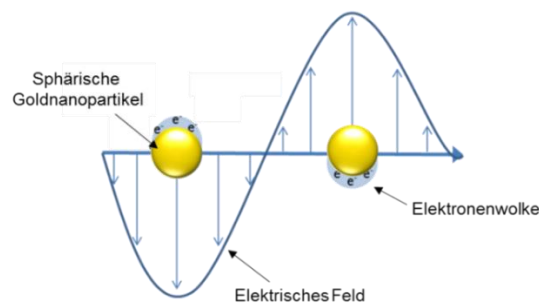


Abb. 41: Schematische Darstellung der Oberflächenplasmonenresonanz von sphärischen Goldnanopartikeln (abgeändert nach ^[136]).

Je nach Partikelbeschaffenheit weisen die jeweiligen Goldnanopartikellösungen aufgrund ihrer Absorption eine charakteristische Färbung auf. Sphärische Nanopartikel (< 20 nm) besitzen z.B. eine rote Farbe, das Extinktionsspektrum weist ein Maximum bei einer Wellenlänge von ~ 520 nm auf. Je größer die Partikel, desto größer wird auch die absorbierte Wellenlänge.^[136] Bei Goldnanopartikeln mit einem Durchmesser von < 5 nm ist die Plasmonenoszillation stark gedämpft, bei Nanopartikeln < 2 nm verschwindet sie hingegen komplett.^[137] Liegen die Nanopartikel allerdings aggregiert vor, bzw. bei großen Partikeln, wird das Maximum der Plasmonenresonanz (SPR-Peak) zu höheren Wellenlängen verschoben.^[138] Beim Vorhandensein größerer Aggregate oder Agglomerate kann demnach ein Farbumschlag der kolloidalen Lösung von rot nach violett beobachtet werden. So können schon anhand der Farbe erste Rückschlüsse auf die Stabilität der Goldnanopartikel in Lösung gezogen werden.

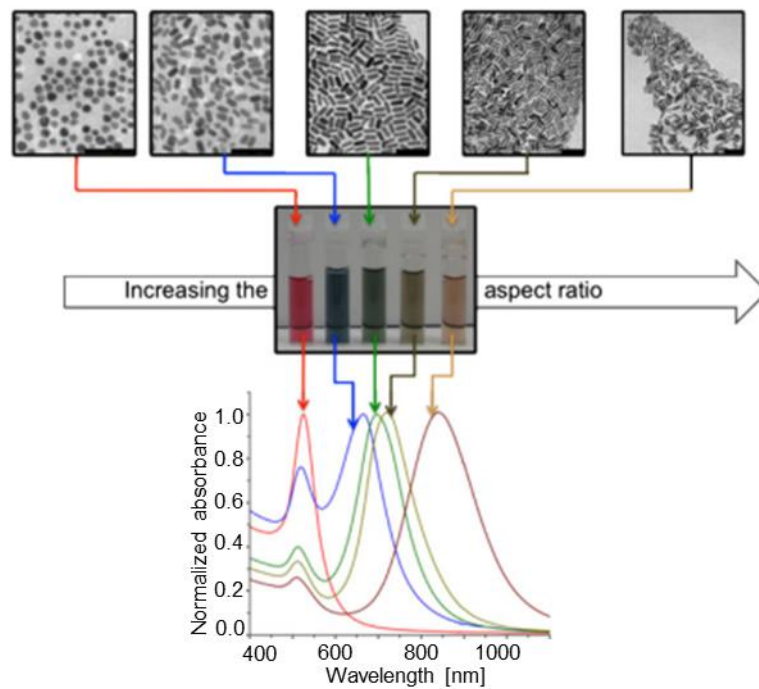


Abb. 42: Übersicht von verschiedenen Goldnanopartikelformen, die daraus resultierenden unterschiedlichen Farben und charakteristischen UV/Vis-Spektren.^[139]

Goldnanopartikel besitzen zusätzlich die Eigenschaft Fluoreszenzintensitäten von Fluorophoren über eine Distanz von über 10 nm zu beeinflussen.^[140,141] Hierbei werden die Fluoreszenzen durch die Goldnanopartikeloberfläche gequencht und es ist möglich, die Veränderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Entfernung zum Goldnanopartikel zu messen. Diese Methode eignet sich z.B. für Nachweisverfahren in der medizinischen Diagnostik.^[142]

1.3.2 Goldnanopartikel in der Medizin

Nanostrukturen werden schon seit einiger Zeit in der Medizin eingesetzt, so können beispielsweise Goldnanopartikel durch ihre starke Oberflächenplasmonenresonanz für photothermische Anwendungen genutzt werden.^[143–147] Das Absorptionsmaximum liegt im sichtbaren bzw. Nahinfrarotbereich, wodurch sich die Partikel durch Bestrahlung einer entsprechenden Lichtquelle erhitzen lassen. Bei der Krebstherapie könnten sich z.B. die Goldnanopartikel in den Zellen anlagern und durch die Hitzeentwicklung ein Absterben der Zellen bewirken.^[148]

Ebenfalls könnten Medikamente zielgerichteter ihren Wirkort erreichen, wenn ihre Wirkstoffe auf der Nanopartikeloberfläche immobilisiert vorliegen und mit Hilfe der Partikel zum Zielort

transportiert werden könnten.^[149,150] Chan *et al.* zeigten, dass die Größe und Form der Nanopartikel auch deren Zellgängigkeit beeinflusst.^[151,152] Dabei kann die Zellgängigkeit durch immobilisierte Liganden auf der Nanopartikeloberfläche erleichtert werden.^[153]

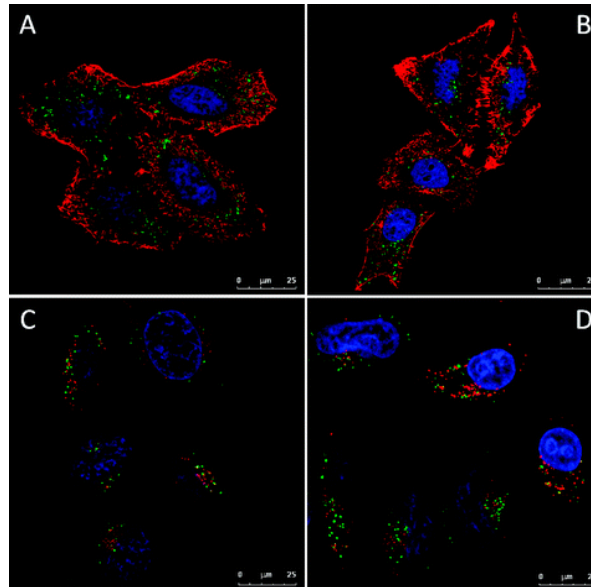


Abb. 43: Konfokalmikroskopieaufnahmen von HeLa-Zellen mit Goldnanopartikeln. (A, B) Aufnahmen von fixierten Zellen, Zellkernfärbung mit Hoechst 33258 (blau), Aktin-Zytoskelett mit Alexa Fluor 488 Phalloidin (rot) und reine Goldnanopartikel (grün). (C, D) Aufnahmen von lebenden Zellen, Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau), lysosomale Kompartimente mit LysoTracker (rot), Goldnanopartikel (grün).^[154]

Für den Einsatz zur Bekämpfung von neurodegenerativen Krankheiten müssen die verwendeten Pharmaka vor allem im Gehirn wirken, um z.B. *plaques* aufzulösen oder deren Aggregation zu inhibieren.^[155] Eine Applikation durch direkte Injektion in das menschliche Gehirn wäre mit vielen Komplikationen verbunden und auch nicht für die tägliche Anwendung geeignet. So müssen die Wirkstoffe im Körper folglich die Bluthirnschranke passieren können. Die Bluthirnschranke (engl. *blood-brain barrier*, BBB) schützt das Gehirn vor Fremdkörpern (z.B. Krankheitserreger oder Toxine) im Blut und filtert diese heraus. Rund 98 % der potentiellen Wirkstoffe können die BBB nicht überwinden und gelangen somit nicht an ihr eigentliches Einsatzgebiet. Allgemein können nur kleine Moleküle (< 400-500 g/mol) durch die Bluthirnschranke gelangen.^[156]

Jong *et al.* stellten in ihren Untersuchungen eine deutliche Größenabhängigkeit bei Goldnanopartikeln in Bezug auf deren Bluthirnschrankengängigkeit fest. Kleine Nanopartikel (10 nm) konnten 24 Stunden nach intravenöser Applikation in vielen Körperregionen der Versuchstiere (Leber, Niere, Hoden, Blut, Herz, Lunge, Gehirn) nachgewiesen werden, während sich größere

Nanopartikel (bis 250 nm) nur im Blut, in der Leber und Milz ansammeln.^[157] In andere Studien konnte ein Größenlimit zur BBB-Gängigkeit von 20 nm ermittelt werden.^[158,159]

Schlecht wasserlösliche Wirkstoffmoleküle könnten ebenfalls zuerst auf kleine Goldnanopartikel immobilisiert werden, die BBB passieren und anschließend im Gehirn wirken.^[160,161] Koffie *et al.* zeigten, dass eigentlich BBB-undurchlässige Fluorophore auf PBCA Nanopartikeln immobilisiert (mit Polysorbat 80 beschichtete Poly(*n*-butylcyanoacrylat-Partikel)) durch die Blut-hirnschranke in Mäusegehirne transportiert werden konnten.^[162]

Erste Ansätze, speziell in der Alzheimertherapie, werden aktuell durch Verwendung kleiner Goldnanopartikel oder Partikel mit unterschiedlichen Liganden immobilisiert verfolgt.^[163–165]

Kim *et al.* untersuchten die Wirkung von Goldnanopartikeln auf die A β -Aggregation. In deren Ergebnissen wurde gezeigt, dass größere Goldnanopartikel (> 50 nm) auch größere amorphe A β -Aggregate und kleinere Goldnanopartikel (20 nm) protofibrilläre A β -Strukturen induzieren konnten. Aminmodifizierte Goldnanopartikel (positive Gesamtladung der Konjugate) konnten stärker an A β -Fibrillen binden als citratmodifizierte Goldnanopartikel (negative Gesamtladung der Konjugate). Dies führte dazu, dass das A β -Peptid weniger in der β -Faltblatt- und mehr in der *random coil* Anordnung vorlag.^[166]

Liao *et al.* zeigten bei der kürzeren A β -Variante A β (1-40), dass reine Goldnanopartikel (30 nm) die Morphologie der Fibrillen verändern und Oligomere induzieren konnten. Aminfunktionalisierte Goldnanopartikel inhibierten ebenfalls die Fibrillenbildung, carbonylfunktionalisierte Nanopartikel hingegen nicht. Die beobachtete Wirkung bei reinen Nanopartikeln entstand vermutlich durch unspezifische Wechselwirkungen von A β mit der negativen Nanopartikeloberfläche.^[167] Andere Forschungsgruppen immobilisierten kurze Peptide auf die Goldoberfläche und untersuchten die Wechselwirkung der Konjugate z.B. mittels TEM und ThT-Messungen.^[168–172]

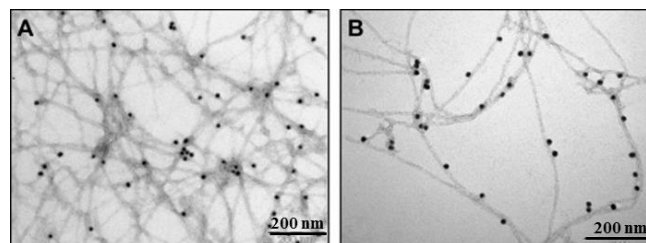


Abb. 44: TEM-Aufnahmen von A β (1-42)-Fibrillen mit Goldkonjugaten: (A) AuNP mit THR-CLPFFD und (B) AuNP mit CLPFFD.^[173]

Die Verwendung von Peptiden oder Molekülen auf Nanopartikelträgermaterialien zeigte bisher viele interessante Ergebnisse. Dieser Ansatz sollte weiter erforscht und ausgebaut werden. Er bildet somit die Grundlage für die folgende Arbeit.

2 Aufgabenstellung

Die Alzheimersche Krankheit basiert auf der spontanen Fehlfaltung von löslichen Proteinen und ihrer anschließenden Aggregation durch Akkumulierung der Proteine im Gehirn. Die Sekundärstrukturänderung bei Proteinmonomeren von einer α -helikalen in eine β -faltblattreiche Struktur ist der Auslöser bei der A β -Fibrillogenese. Die Zusammenhänge zwischen den gebildeten A β -Aggregaten und der Alzheimerschen Krankheit werden heute über die modifizierte Amyloid-Kaskaden-Hypothese beschrieben. Hierbei gibt es unterschiedliche Ansatzpunkte, um in die Kaskade von pathologischen Ereignissen einzugreifen. Die naheliegendste Strategie um der Fibrillogenese entgegenzuwirken besteht darin, in den initialen Schritt des Modells einzugreifen: Bei der A β -Aggregation.

Dies hätte den Vorteil, dass ein darauf basierender Wirkstoff die molekulare Ursache der Erkrankung bekämpfen würde und somit den Betroffenen geholfen werden könnte, noch bevor sich vollständige Demenz und extreme Persönlichkeitsveränderungen einstellen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, spezifische Inhibitoren gegen die A β -Aggregation zu finden und besonders der Entstehung von kleinen neurotoxischen Oligomeren entgegenzuwirken. Es sollten D-Peptide zur β -Faltblatterkennung mit einer Disulfideinheit synthetisiert werden, welche in der Lage sein sollten, A β -Oligomere selektiv zu erkennen. Weiterhin sollten verschiedene Aminopyrazolderivate als β -faltblattbrechende Liganden hergestellt werden, welche an die pathologischen A β -Fibrillen binden und somit die Aggregation kleinerer A β -Oligomere effektiv hemmen können.

Durch Laserablation können ligandenfreie monodisperse Nanopartikel in wässriger Lösung hergestellt werden. Die lasergenerierten Nanopartikeloberflächen können bis zu fünfmal dichter mit Liganden belegt werden als die Oberflächen von chemisch hergestellten Nanopartikeln (**Abb. 45**).^[174] Zudem werden keine toxischen Stabilisatoren benötigt, so dass ihr Einsatz für biomedizinische Anwendungen möglich ist.^[174,175]

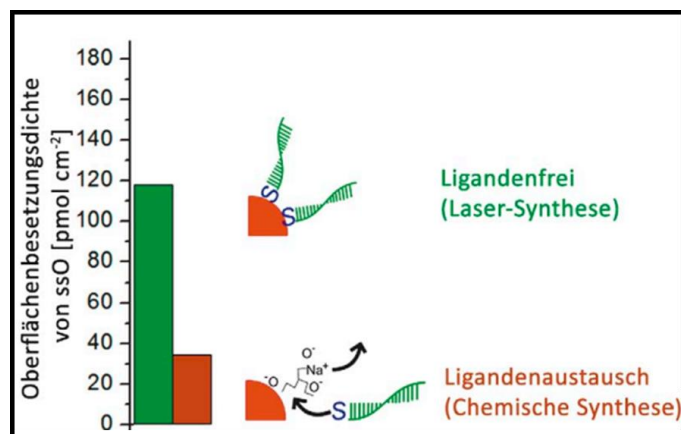


Abb. 45: Maximale Oberflächenbedeckung auf ligandenfreien und citratstabilisierten Goldnanopartikeln (abgeändert nach ^[174]).

Durch die Verwendung von Edelmetallen als Nanopartikelmaterial sind die Partikel biokompatibel und können aufgrund ihrer geringen Größe mit Zellen oder Proteinen interagieren oder als Transportmittel die immobilisierten Wirkstoffe zu deren Einsatzziel, z.B. durch die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn, transportieren.^[155] Außerdem ergibt sich die Möglichkeit, sowohl homo- als auch heterofunktionale Nanokonjugate herzustellen, die einen bzw. zwei verschiedene Ligandentypen gleichzeitig auf ihrer Oberfläche präsentieren.^[176]

Kleine Goldnanopartikel sollten in der vorliegenden Arbeit als ein Transportsystem für die verschiedenen biofunktionalen Liganden dienen, da diese im Gegensatz zu freien polaren Peptiden über die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden können. Ein weiterer Vorteil der Immobilisierung von Liganden auf kleinen Nanopartikeln besteht darin, dass eine hohe lokale Wirkstoffkonzentration auf der Nanopartikeloberfläche erreicht werden kann. So sollte bereits die Verwendung von geringen Mengen der Konjugate signifikante biologische Effekte erzielen.

Die interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen der Organischen Chemie (Ligandensynthese), der Technischen Chemie (Nanopartikelsynthese) und der Biologie (zellbiologische Tests) war hierbei von zentraler Bedeutung, denn sie erlaubte einen Einblick in die Struktur-Funktionsbeziehung der Nanokonjugate mit dem fehlgefalteten Protein (A β). Hierzu sollten verschiedene Liganden mit einem C-terminalen Cystein versehen werden, um eine Immobilisierung auf die Goldoberfläche zu ermöglichen. Eine ausreichende Löslichkeit und Flexibilität, sowie eine allgemeine Größenbegrenzung und verschiedene Nettoladungen waren weitere Anforderungen an die Liganden, so dass die potentesten A β -Inhibitoren unter den Verbindungen selektiert und auf die Goldoberfläche gebracht werden konnten.

Ebenfalls sollten unterschiedliche Grade der Ligandenbelegung auf der Goldoberfläche getestet und die dabei erhaltene Stabilität der Konjugate optimiert werden. Um den angestrebten synergistischen Effekt zu erzielen, sollten sowohl mono- als auch bifunktionale Konjugate hergestellt werden.

Nachdem die optimalen Konjugationsbedingungen und potentesten Inhibitoren gefunden wurden, sollten die neurotoxischen Proteinaggregationsprozesse durch Verwendung von substöchiometrischen Ligandenkonzentrationen verhindert werden.

In früheren Arbeiten zeigte eine Hybridverbindung aus einem β -Faltblattselektor (D3-Peptid) und einem β -Faltblattbrecher (trimeres Aminopyrazol) neue synergistische Effekte, welche die Einzelverbindungen nicht aufweisen konnten.^[83,87,177]

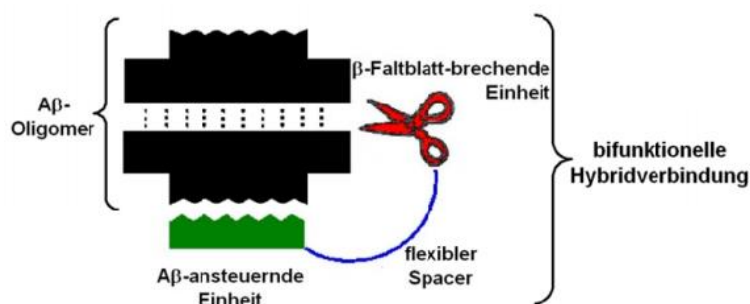


Abb. 46: Potentielle Wirkungsweise der Hybridverbindung gegen $A\beta$ -Oligomere.^[86]

Bei den Hybridverbindungen wurden die Einzelliganden kovalent miteinander in einem Molekül verbunden. Im Gegensatz dazu sollten die beiden Einzelliganden bei den bifunktionalen Konjugaten nebeneinander auf die Nanopartikeloberfläche immobilisiert werden. Hier sollte nun untersucht werden, ob die synergistischen Eigenschaften der Hybridverbindung auch bei den bifunktionalen Konjugaten zu beobachten sind.

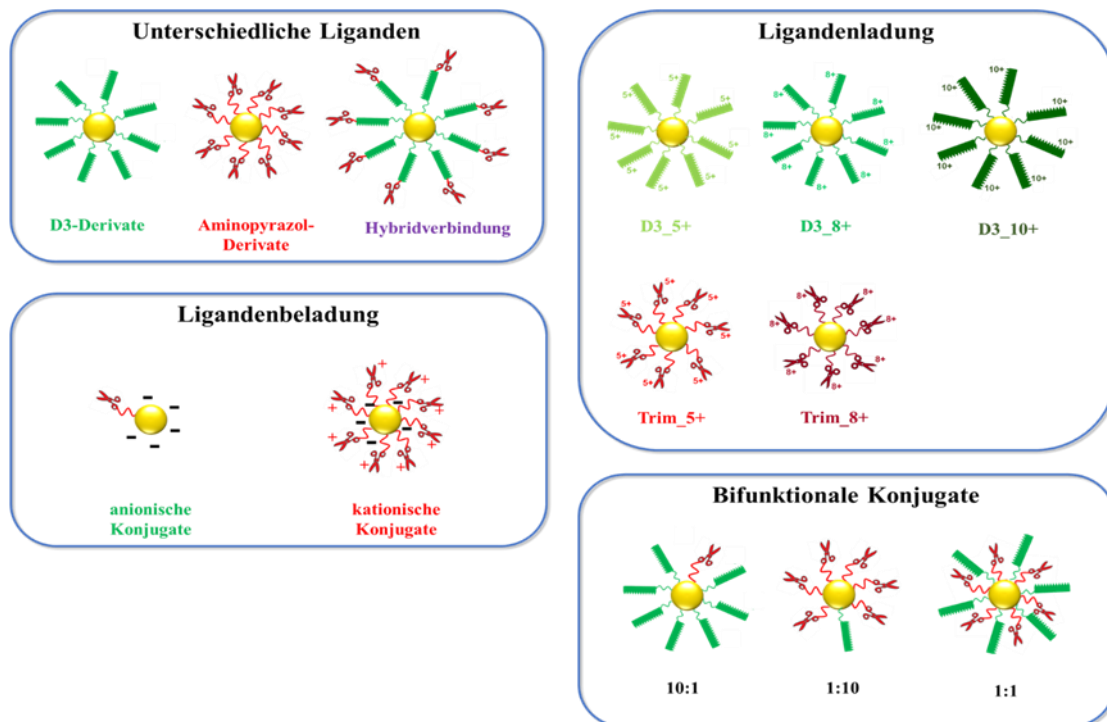


Abb. 47: Schematische Übersicht der in dieser Arbeit geplanten Forschungsansätze.

Die einzelnen Nanokonjugate, sowohl mono- als auch bifunktional, sollten schlussendlich auf ihre Wirksamkeit gegenüber dem A β -Peptid analysiert werden. Hierfür sollten vor allem die Wechselwirkungen mit verschiedenen A β -Spezies (Monomere, Oligomere oder Fibrillen, synthetisches oder *in vivo* exprimiertes A β) und die Spezifität des A β -Selektors untersucht werden. Als Untersuchungsmethoden dienen dabei biophysikalische Assays und biologische Experimente. Mit ThT und CD-Experimenten sollten mögliche Wechselwirkungen der Substanzen mit der Sekundärstruktur von A β untersucht werden. Die A β -Morphologie sollte mittels AFM und TEM-Aufnahmen visualisiert, die A β -Aggregatgrößenverteilung mit Hilfe von DGZ/ELISA-Untersuchungen bestimmt werden. Ebenfalls sollte die Selektivität und Spezifität der Liganden auf den Nanopartikeln überprüft werden.

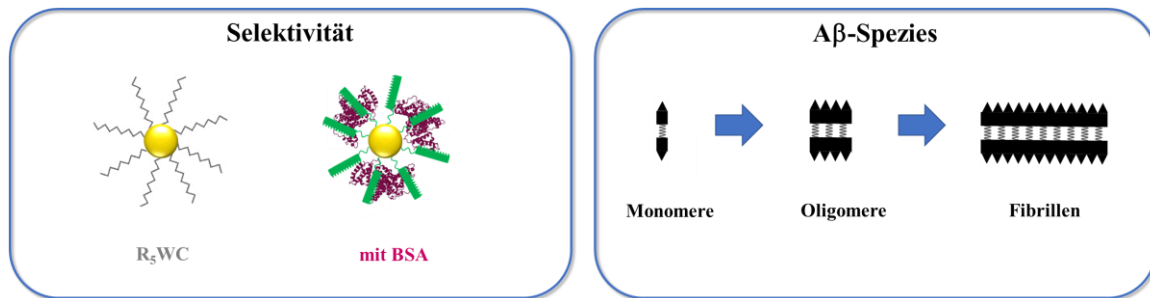


Abb. 48: Darstellung der Konjugate zur Überprüfung der Selektivität von D3-Liganden (links) und die zu untersuchenden verschiedenen Aβ-Spezies (rechts).

Der hypothetische Wirkmechanismus der bifunktionalen Konjugate wird in **Abb. 49** schematisch dargestellt. Unterschiedliche Funktionseinheiten werden kovalent auf ligandenfreie Nanopartikel immobilisiert (1. Schritt). Der erste Ligand, ein D3-Derivat, erkennt die Aβ-Sequenz und bindet diese selektiv (2. Schritt). Ein zweiter Ligand, die trimere Aminopyrazoleinheit, bricht die Aβ-Faltblätter auf (3. Schritt). Letztlich wird Aβ durch einen synergistischen Mechanismus der beiden Liganden in nichttoxische Aβ-Aggregate umgewandelt.

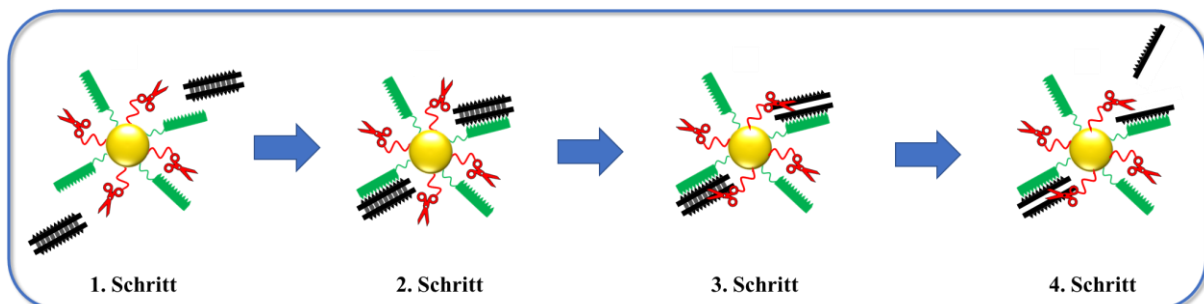


Abb. 49: Konzept der Wechselwirkung von bifunktionalen Goldnanopartikeln mit Aβ (Aβ-Fibrille in schwarz, AuNP in gelb, Aminopyrazolliganden in rot und D3-Liganden in grün).

3 Durchführung und Ergebnisse

Bevor die ersten Liganden-Nanopartikel-Konjugate auf ihre inhibierende Wirksamkeit bei der A β -Aggregation in unterschiedlichen Experimenten untersucht werden konnten, mussten die neuen Ligandeneinheiten zuerst synthetisiert werden. Als erstes wurden C-terminal modifizierte D3-Peptide (A β -Oligomer selektierende Einheiten) hergestellt. Als zweite funktionale Einheit wurden die trimeren Aminopyrazolliganden (β -faltblattbrechende Einheit) entwickelt. Diese können durch ihr D-A-D-Bindungsmotiv das Rückgrat von Peptiden erkennen und wirksam die Umfaltung längerer Peptide in die β -Faltblattkonformation verhindern.

Ebenfalls wurde eine neue Hybridverbindung aus beiden Ligandeneinheiten (Trimer-D3-Cys-Ligand) synthetisiert. Die Hybridverbindung auf Nanopartikel immobilisiert, sollte als Vergleich zu bifunktionalen Konjugaten dienen, bei denen die beiden Liganden (Trimer und D3) nebeneinander auf der Nanopartikeloberfläche wirken konnten.

Es konnten insgesamt vier verschiedene D3-Liganden **28, 29, 30, 49** hergestellt werden. In der **Abb. 50** sind die Strukturen der neuen Peptidverbindungen dargestellt.

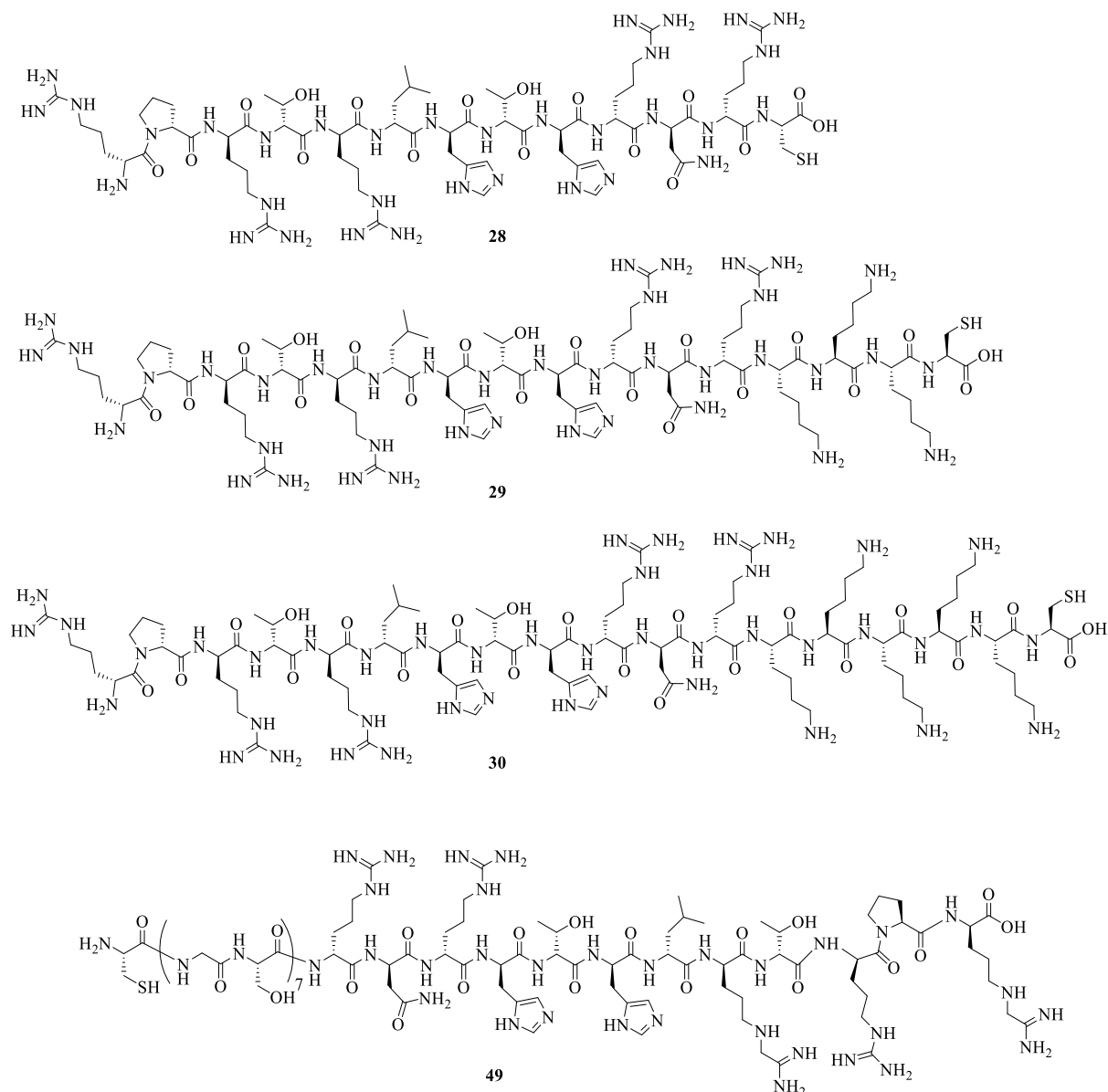


Abb. 50: Übersicht der synthetisierten neuen D3-Liganden **28**, **29**, **30**, **49**.

Zusätzlich wurden drei weitere D3-Derivate **31**, **32**, **33**, die entweder UV- oder fluoreszenzaktiv waren, synthetisiert. Diese modifizierten Peptide konnten zur Bestimmung der Ligandendichte auf den Nanopartikeln eingesetzt werden. Hierzu wurden die Konjugate zentrifugiert und die ungebundenen Liganden, welche sich noch im Überstand befanden, gemessen. Anschließend konnten so Rückschlüsse auf die Anzahl der gebundenen Liganden auf der Oberfläche gezogen werden. Die Strukturen der modifizierten Verbindungen sind in **Abb. 51** dargestellt.

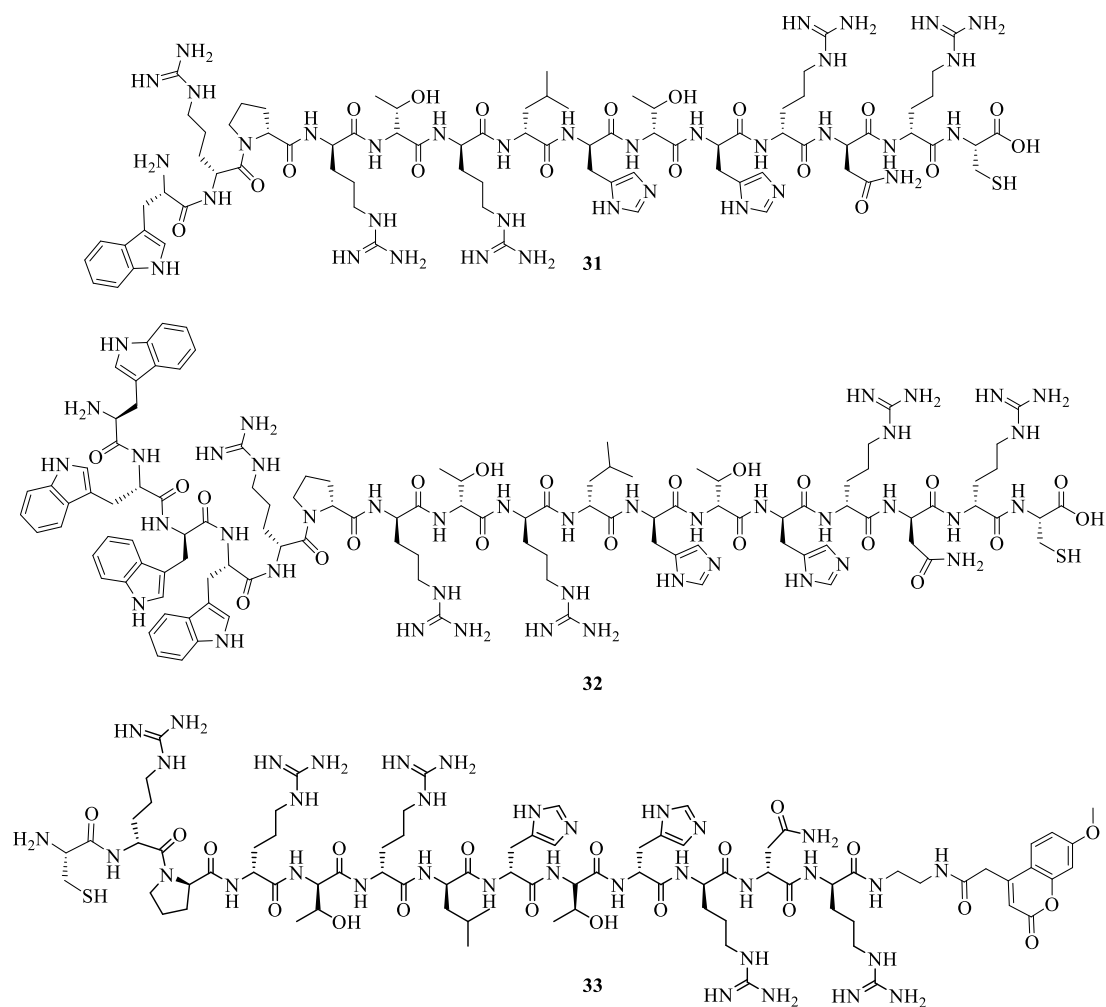


Abb. 51: Übersicht der synthetisierten neuen UV-bzw. fluoreszenzaktiven D3-Liganden 31, 32, 33.

Als β -faltblattbrechende Einheit wurden zwei neue Aminopyrazolliganden **46** und **47** und eine neue Trimer-D3-Hybridverbindung **48** synthetisiert. Die Strukturen der Liganden sind in **Abb. 52** dargestellt.

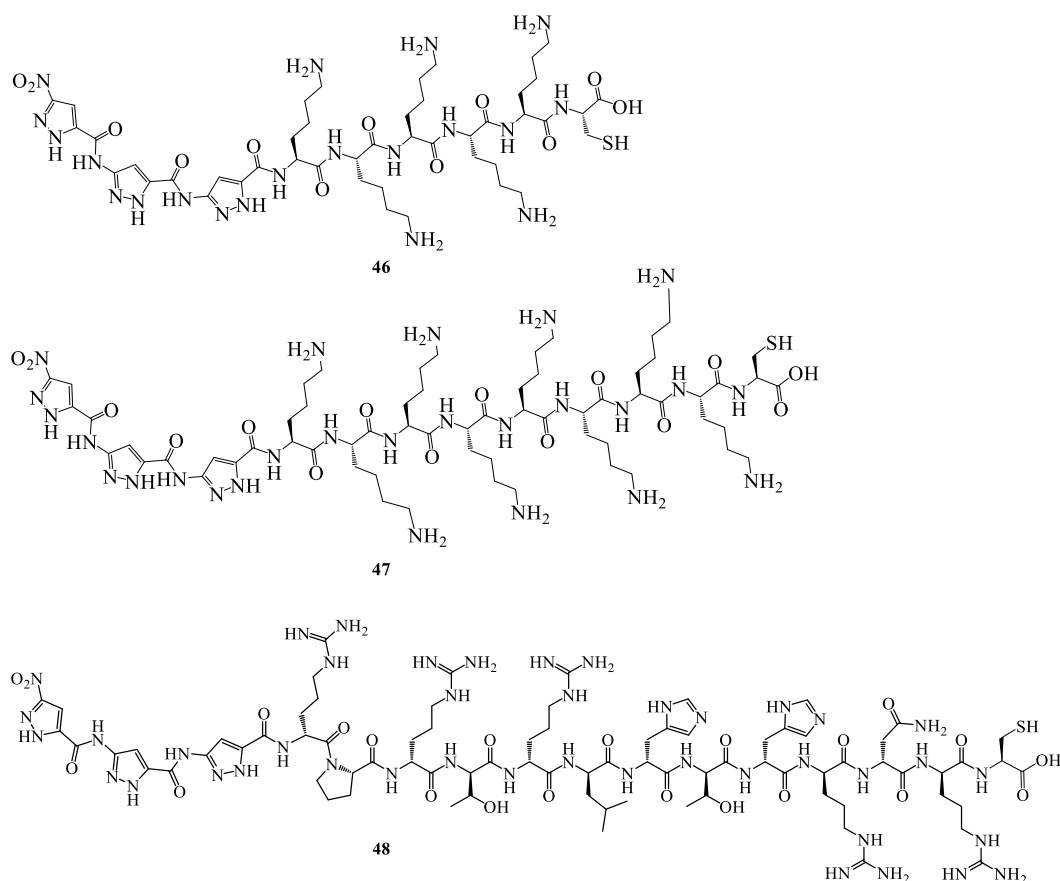


Abb. 52: Darstellung der neuen Aminopyrazolliganden 46, 47 und der Hybridverbindung 48 aus trimerem Aminopyrazol und D3-Peptid.

Die zwei nächsten Kapitel sind in die beiden Funktionseinheiten A β -Selektoren (Kapitel 3.1) und A β -Faltblattbrecher (Kapitel 3.2) eingeteilt. Mit den jeweiligen Ligandentypen konnten monofunktionale Nanopartikel hergestellt und analysiert werden. Ein drittes Kapitel widmet sich den bifunktionalen Nanopartikeln (Kapitel 3.3). Die beiden Ligandentypen wurden gemeinsam auf die Nanopartikeloberfläche immobilisiert und untersucht. Zusätzlich werden die Ergebnisse der Hybridverbindung, frei und auf Goldnanopartikeln, diskutiert. Es konnte weiter ein neuer wesentlich längerer D3-Ligand mittels Moleküldynamiksimulationen erzeugt und diese Berechnungen synthetisch umgesetzt werden. Die Charakterisierung und ersten Untersuchungsergebnisse des verlängerten D3-Peptids werden ebenfalls in dem dritten Kapitel behandelt und mit den Ergebnissen der vorherigen D3-Peptide verglichen.

3.1 A β -Erkennungseinheit (Selektoren)

3.1.1 Synthese der D3-Derivate

Die ersten biofunktionalen Einheiten, die D3-Derivate, wurde mittels automatischer Festphasenpeptidsynthese (SPPS) hergestellt. Hierzu wurde ein Mikrowellenpeptidsynthesizer und die Fmoc-Schutzgruppenstrategie eingesetzt. Die Aminosäurekupplungen erfolgten vom C-zum N-Terminus. Es wurde ein Wang-Harz mit vorbeladenem Fmoc-L-Cys(Trt)-OH als polymerer Träger verwendet. Zu Beginn wurde die Aminosäure durch eine sekundäre Base wie Piperidin entschützt. An den N-Terminus wurde anschließend eine weitere Aminosäure mit Hilfe eines Kupplungsreagenz (HCTU) und einer Base (DIPEA) gekuppelt. Jeder weitere Kupplungsschritt wurde mit Fmoc-geschützten Aminosäuren durchgeführt, wobei eine Doppelkupplung bei den Aminosäuren Fmoc-D-Leu-OH und Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH genutzt wurde. Nach der Synthese konnte das Peptid mittels Abspaltungsreagenzien vom Harz entfernt werden.

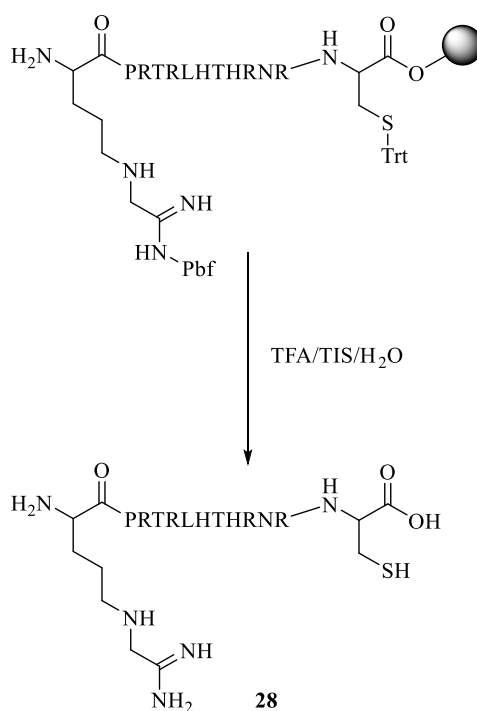


Abb. 53: Syntheschema zur Herstellung der Verbindung D3-Cys (D3_5+) (28).

Das erste Derivat D3-Cys (D3_5+) **28** besaß eine Nettoladung von +5. Nach erfolgreicher Synthese wurde die Verbindung spektroskopisch untersucht. Hierbei konnten alle in dem ^1H -NMR-Spektrum detektierten Signale den jeweiligen Aminosäureprotonen zugeordnet werden (**Abb. 54**). Das Produkt konnte mit einer Reinheit von > 98 % erhalten werden.

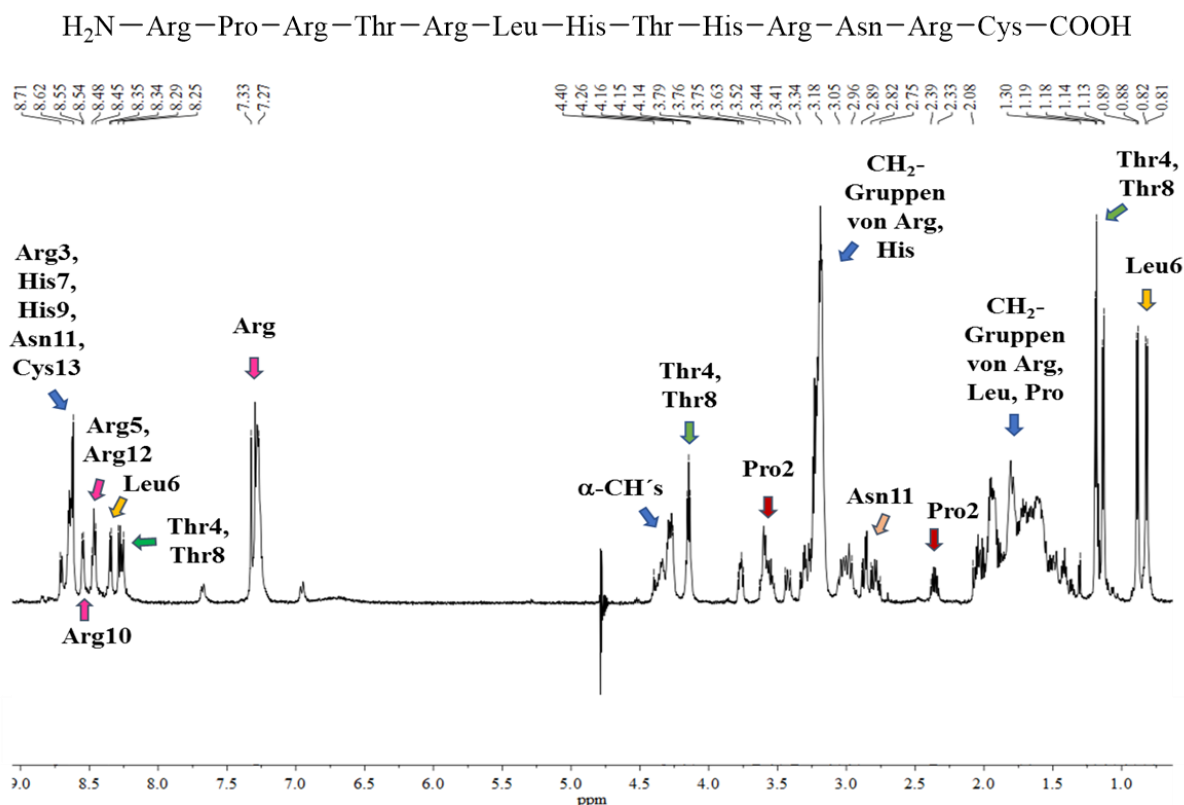


Abb. 54: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **28** und Zuordnung der Signale (farblich markiert).

Um weitere D3-Liganden mit unterschiedlichen Nettoladungen zu erhalten, wurden zwischen der endständigen Aminosäure Cystein und dem D3-Peptid mehrere Aminosäuren mit basischen Seitenketten (Lysine) gekuppelt. So konnten, je nach Länge der Lysinketten, zwei weitere polykationische D3-Peptide hergestellt werden (**Abb. 55**)

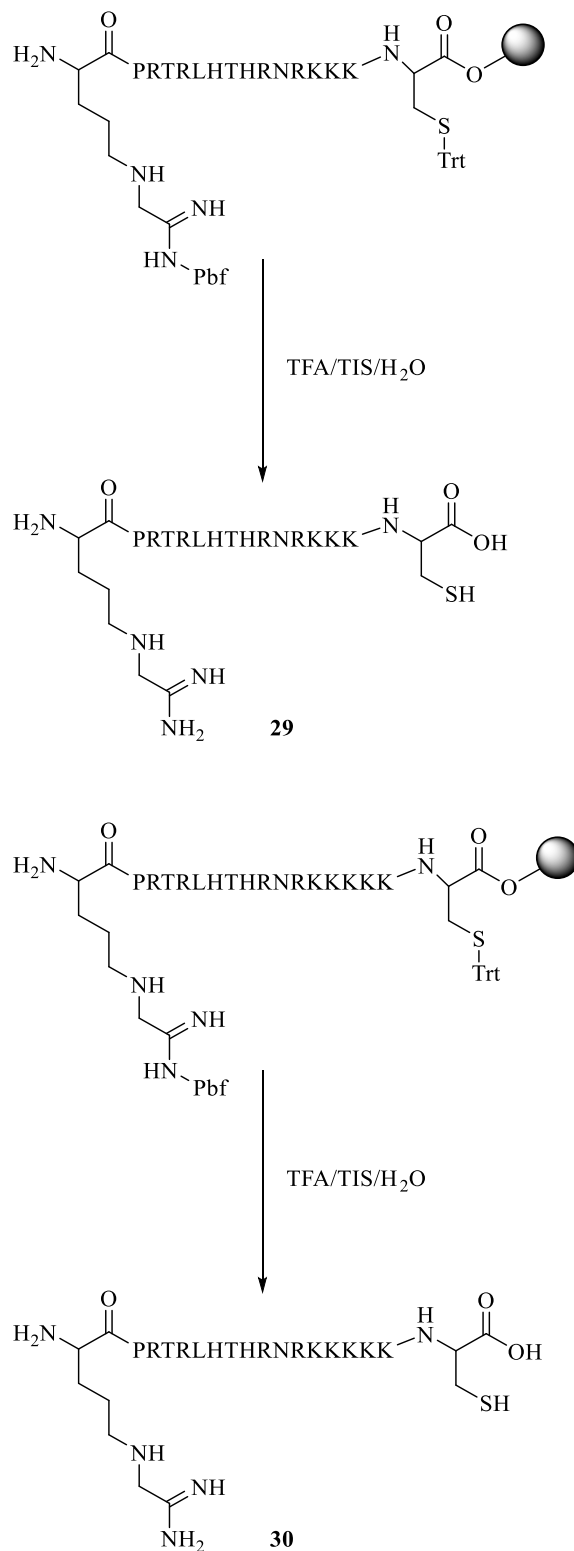


Abb. 55: Synthesepfad der Verbindungen D3-(Lys)₃-Cys (29) (D3_8+) und D3-(Lys)₅-Cys (30) (D3_10+).

Die Verbindung **29** besaß insgesamt eine Nettoladung von +8, Verbindung **30** eine Nettoladung von +10. Nach Abspaltung vom Polymerträger konnten die Peptide mit einer Reinheit von > 90 % aus kaltem Diethylether gefällt werden.

Insgesamt wurden durch die automatische Festphasenpeptidsynthese drei neue positiv geladene D3-Derivate als Erkennungseinheit für A β -Oligomere hergestellt, um diese später auf Goldnanopartikel zu immobilisieren (**Abb. 56**).

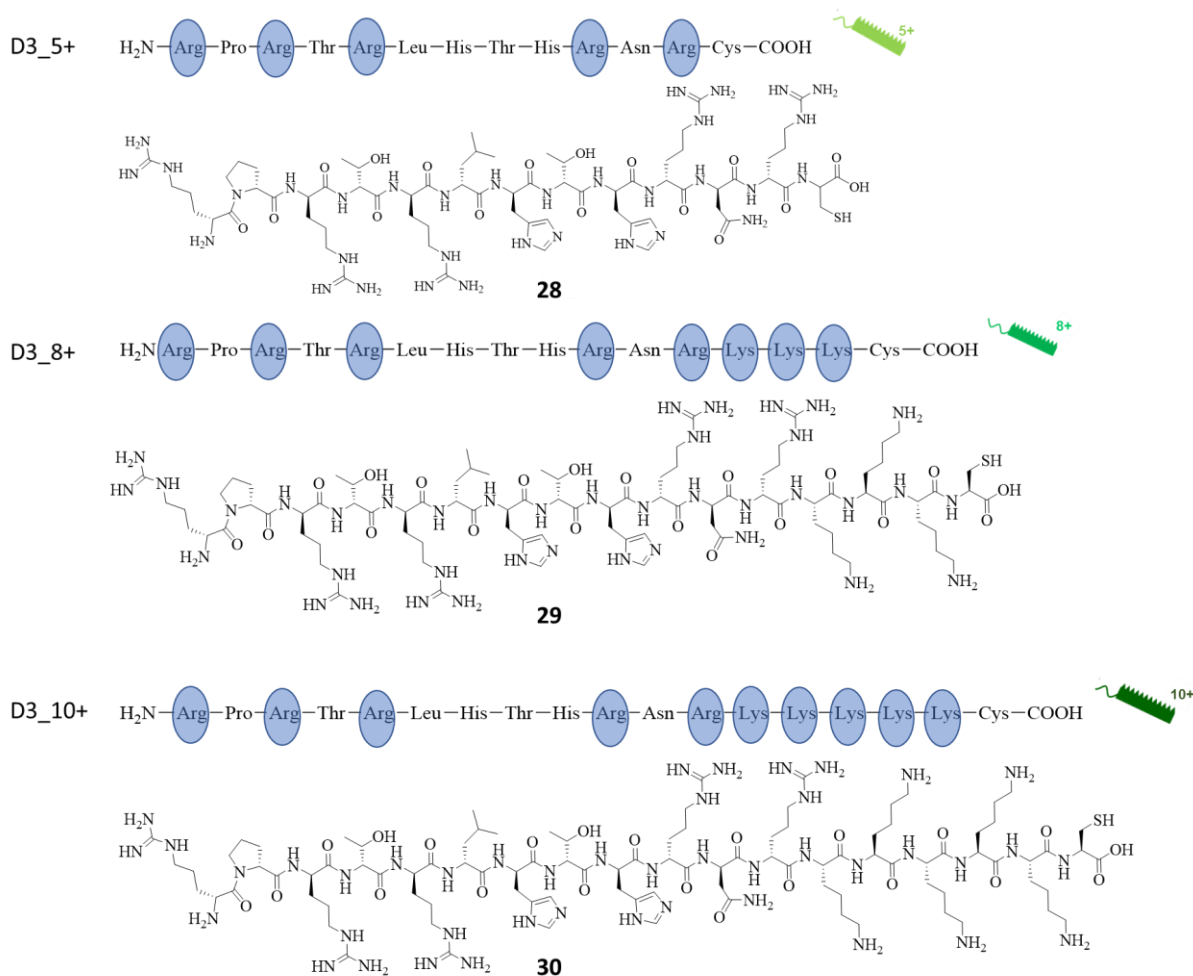


Abb. 56: Strukturen der D3-Derivate mit unterschiedlichen Nettoladungen (positiv geladene Aminosäuren in blau).

3.1.2 Herstellung und Charakterisierung von lasergenerierten Goldnanopartikeln

Die Herstellung, Reinigung und Charakterisierung von monodispersen Goldnanopartikeln in wässriger Lösung durch Laserablation wurde in einer Kooperation mit der Technischen Chemie von *Carmen Streich* aus dem Arbeitskreis Barcikowski (Technische Chemie, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt.^[178]

Hierfür wurde ein Laserstrahl auf ein Goldtarget in wässriger Lösung (0.1 mM NaCl) gerichtet, wodurch Goldnanopartikel abgetragen werden konnten. Anschließend wurde die Nanopartikel-suspension zur Aufreinigung zentrifugiert. Von der Lösung wurden die oberen 4/5 verwendet, der Rest bestand aus größeren Nanopartikeln ($d > 20$ nm) und wurde verworfen.

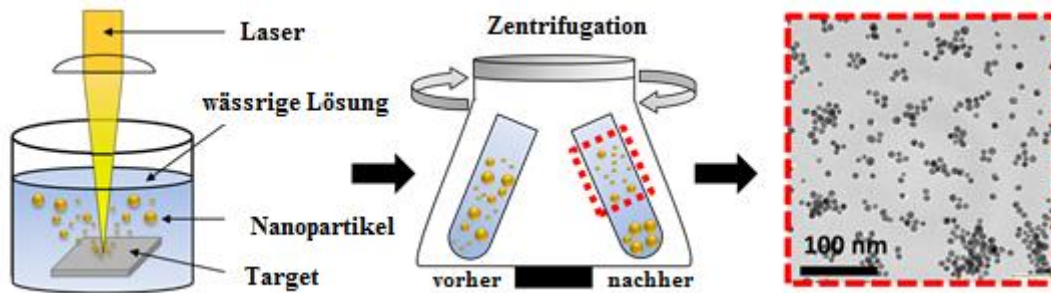


Abb. 57: Lasergenerierte Goldnanopartikel und anschließende Aufreinigung durch Zentrifugation.^[179]

Die Konzentration der Partikel konnte durch UV/Vis-Messungen bestimmt werden. Eine Größenbestimmung der Goldnanopartikel erfolgte sowohl durch TEM-, AFM- und DLS-Messungen als auch in der analytischen Scheibenzentrifugation (ADC). Die Partikelladung konnte mittels Zetapotentialmessungen festgestellt werden.^[178]

Die hergestellten Goldnanopartikel besaßen vor der Zentrifugation einen Durchmesser von 11 ± 4 nm, nach der Zentrifugation lag der Durchmesser bei 7 ± 1 nm. Die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Goldnanopartikelkonzentration betrug $50 \mu\text{g/mL}$ in Reinstwasser.^[179]

Bei Goldnanopartikeln bestand durch ihre spezifischen Eigenschaften die Möglichkeit, dass Interferenzen mit der Plasmonenresonanz auftreten könnten. Um diese Fehlerquelle ausschließen zu können, wurden die Goldnanopartikel in Funktionstests zusätzlich durch Platinnanopartikel (PtNP) ersetzt. Zeigten die hergestellten Konjugate aus Platinpartikeln mit entsprechenden Liganden ähnliche Eigenschaften wie die Goldkonjugate, so konnten die möglichen Interferenzen vernachlässigt werden.

In **Abb. 58** sind die Ergebnisse der Zetapotentialmessungen, des hydrodynamischen Durchmessers der Partikel und die aufgenommenen UV/Vis-Spektren sowohl von den Goldnanopartikeln als auch von den Platinnanopartikeln gegenübergestellt.

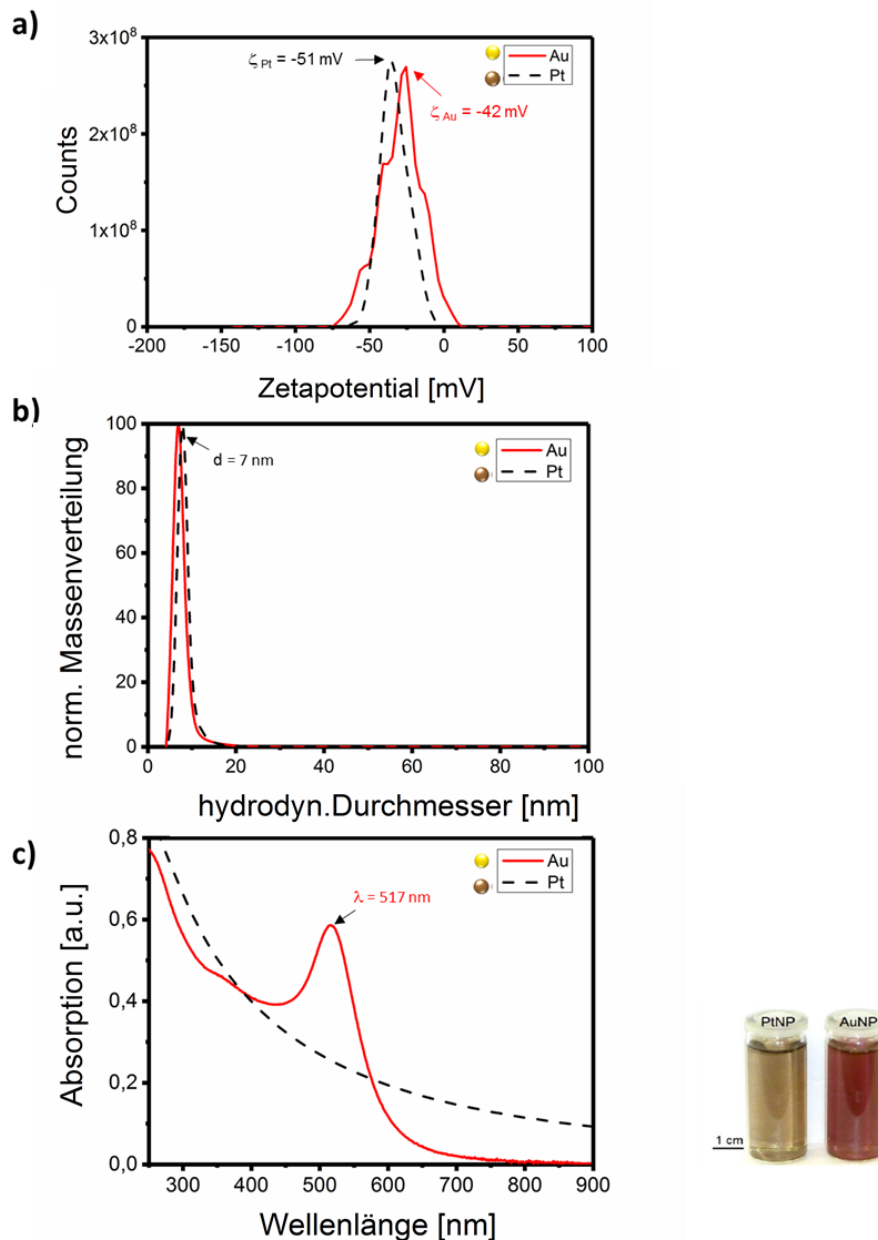


Abb. 58: Bestimmung des Zetapotentials (a), Größenverteilung der Nanopartikel (b) und UV/Vis-Spektrum (c) von lasergenerierten Gold- und Platinnanopartikeln (links). PtNP und AuNP in Lösung mit ihrer jeweils charakteristischen Färbung (rechts).^[179]

Lasergenerierte Platinnanopartikel (hergestellt in 1 mM NaCl) wiesen eine größere oxidierte Oberfläche auf als Goldnanopartikel. Bei Platinnanopartikeln sind bis zu 50 % der Oberfläche oxidiert, bei Goldnanopartikeln jedoch nur bis zu 6 %.^[180,181] Die große oxidierte Oberfläche der Platinpartikel spiegelte sich auch im gemessenen Zetapotential wieder: Bei Goldnanopartikeln wurde ein Zetapotential von ca. -42 mV gemessen, Platinnanopartikel hatten hingegen ein Zetapotential von -51 mV (Abb. 58a). Die hergestellten Platinnanopartikel besaßen ebenfalls, wie die Goldnanopartikel, einen Durchmesser von 7 nm (Abb. 58b).

In dem UV/Vis-Spektrum in **Abb. 58c** wird das charakteristische Absorptionsmaximum (SPR-Peak) von Goldnanopartikeln bei 517 nm dargestellt, wohingegen Platinnanopartikel im sichtbaren Spektrum keinen SPR-Peak aufwiesen.

3.1.3 Goldnanopartikel mit D3-Derivaten

Zur Immobilisierung der Liganden auf Goldnanopartikel wurden die Liganden in dest. Wasser gelöst und zu den lasergenerierten Nanopartikeln in Lösung pipettiert. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der Konjugate.^[178] Um effektive Konjugate zur Erkennung von A β -Oligomeren herzustellen, wurden drei verschiedene D3-Derivate verwendet und untersucht. Zusätzlich wurde in späteren Funktionalitätstests ein Heptapeptid (R)₅WC (Nettoladung +5) als Negativkontrolle eingesetzt. Mit diesem Peptid sollte getestet werden, ob die D3-Derivate sequenzspezifisch mit dem A β -Peptid interagieren oder ob deren Wirkung nur auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem A β -Peptid und den kationischen Ladungen innerhalb des Peptids zurückzuführen war. **Tab. 3** zeigt eine Übersicht der in diesem Kapitel verwendeten Liganden.

Tab. 3: Übersicht der untersuchten D3-Derivate und deren Eigenschaften.

Ligand	Aminosäuresequenz	Summenformel	Molare Masse [g/mol]	Nettoladung (pH = 7)
D3_5+ (28)	RPRTLHTHRNRC	C ₆₈ H ₁₁₉ N ₃₃ O ₁₇ S	1702	+5
D3_8+ (29)	RPRTLHTHNRKKKC	C ₈₆ H ₁₅₅ N ₃₉ O ₂₀ S	2087	+8
D3_10+ (30)	RPRTLHTHNRKKKKKC	C ₉₈ H ₁₇₉ N ₄₃ O ₂₂ S	2343	+10
(R)₅WC	RRRRRWC	C ₄₄ H ₇₇ N ₂₃ O ₈ S	1088	+5

Alle drei Liganden erhöhten nach ihrer Immobilisierung auf Goldnanopartikel den hydrodynamischen Durchmesser der Partikel um 3-5 nm. Ebenfalls änderte sich das negative Zetapotential der reinen Goldnanopartikel durch die Ligandenimmobilisierung ins Positive. Je kationischer das immobilisierte Peptid war, desto höher war auch das Zetapotential des Konjugats (bei einem 418:1-Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis) (**Abb. 59**).

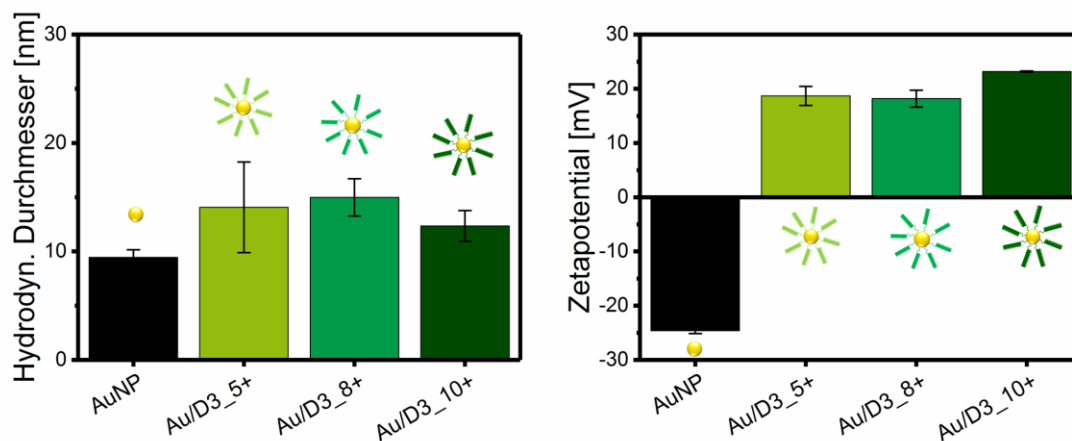


Abb. 59: Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers und des Zetapotentials von reinen Goldnanopartikeln und Au/D3-Konjugaten ($c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{Ligand}) = 10 \mu\text{M}$).^[178]

Anschließend wurde die Stabilität der Konjugate in Abhängigkeit der Ligandenkonzentrationen mittels Zetapotentialmessungen und UV/Vis-Spektroskopie untersucht (**Abb. 60**).^[179] Hierzu wurden die Konjugate stets direkt nach Ligandenzugabe analysiert. Bei den Experimenten wurden jeweils Ligandenkonzentrationen von 0 bis 25 μM verwendet.

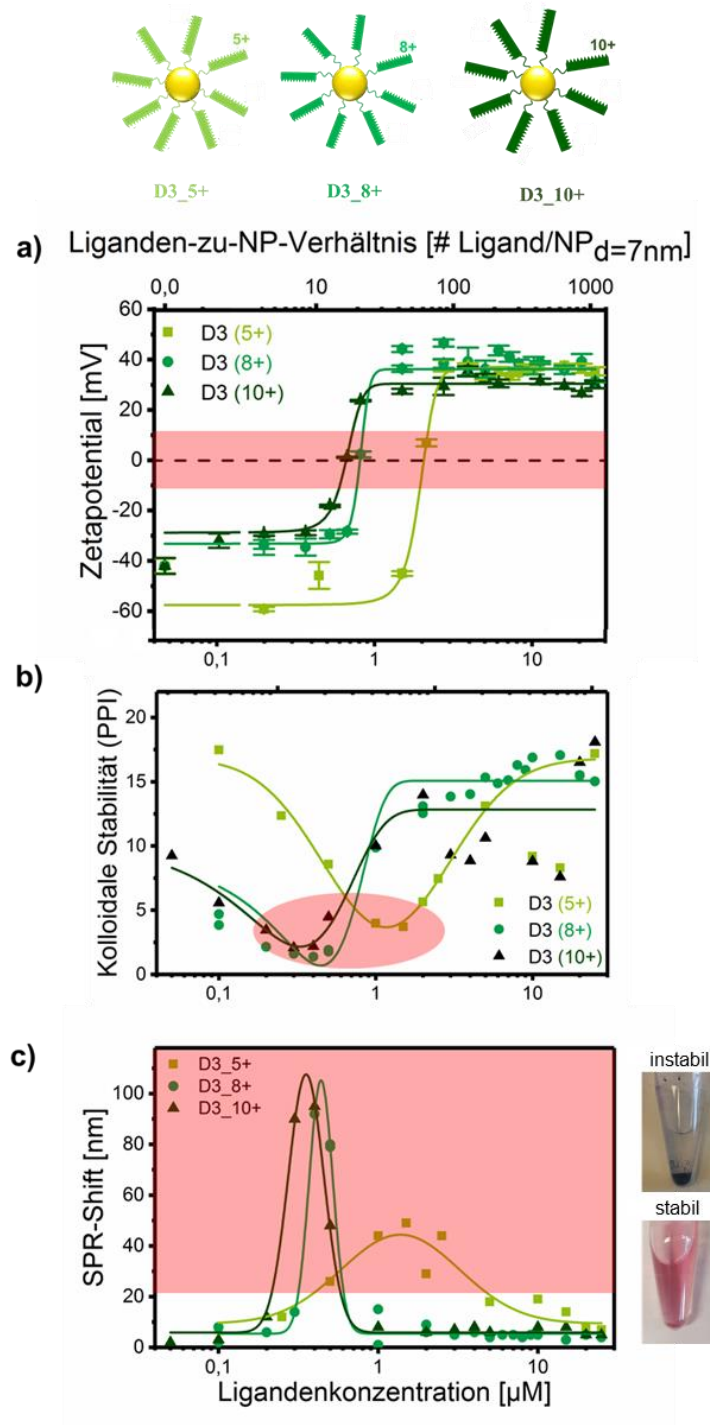


Abb. 60: Stabilitätsmessungen der Konjugate Au/D3_5+, Au/D3_8+ und Au/D3_10+ mittels Bestimmung des Zetapotentials, des PPI und der Verschiebung des SPR-Peaks.^[178,179]

Um stabile Konjugate zu erhalten, musste entweder eine hohe oder eine geringe Menge an kationisch geladenen Liganden auf die negativ geladenen Goldnanopartikel immobilisiert werden, so dass das Zetapotential der Konjugate über 20 mV (Ladung der Liganden überwog), bzw. unter -20 mV (Ladung der Goldnanopartikel überwog) lag. Ein Bereich um 0 mV sollte hierbei

vermieden werden (rot markierter Bereich **Abb. 60a**). Konjugate mit einem neutralen Zetapotential sind sehr instabil und präzipitieren daher schnell aus der Lösung aus.

Der Primärpartikelindex (PPI) ist ein Parameter, der aus UV/Vis-Spektren ermittelt werden kann. Er trifft eine Aussage über die Stabilität der Konjugate und wird anhand des Quotienten aus der Interbandenabsorption (380 nm) und dem Streuungssignal von größeren Partikeln bzw. Aggregaten (800 nm) berechnet. Ein hoher PPI liegt beim Vorhandensein von wenig Aggregaten und damit kolloidal stabilen Nanopartikeln vor.^[175] In **Abb. 60b** werden instabile Konjugate durch den rot markierten Bereich bei einem niedrigen PPI gekennzeichnet.

Sobald die Grenze bei dem Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis über- oder unterschritten wurde, konnte eine Plasmonenresonanzverschiebung beobachtet werden, wobei die Konjugate ab diesem Punkt aus der Lösung präzipitierten (**Abb. 60c**).

D3-Konjugate mit einer allgemein anionischen (4 Liganden/NP) oder kationischen Gesamtladung (125 bzw. 418 Liganden/NP) waren demnach stabil und konnten im Weiteren auf ihre inhibierenden Eigenschaften untersucht werden (**Abb. 61**).

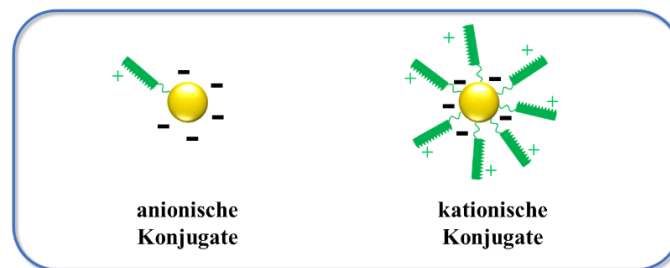


Abb. 61: Schematische Darstellung von anionischen bzw. kationischen D3-Konjugaten.

Für die Bestimmung der Ligandenbeladung auf der Goldoberfläche waren die hergestellten D3-Peptide **28**, **29** und **30** durch ihre Struktur allerdings nicht ausreichend UV-aktiv. Somit mussten modifizierte D3-Derivate synthetisiert werden, an die zusätzlich entweder Tryptophan (Verbindung **31** und **32**) oder Coumarin (**33**) geknüpft wurden.

Mit den neuen Derivaten konnte anschließend die Ligandenbeladung ermittelt werden (**Abb. 64**).

Tab. 4: Übersicht der Eigenschaften der modifizierten D3-Derivate (**31-33**).

Ligand	Aminosäuresequenz	Summenformel	Molare Masse [g/mol]	Nettoladung (pH = 7)
Trp-D3-Cys (31)	WRPRTLHTHRNC	C ₇₉ H ₁₂₉ N ₃₅ O ₁₈ S	1889	+5
(Trp)₄-D3-Cys (32)	WWWWRPRTLHTHRNC	C ₁₁₂ H ₁₅₉ N ₄₁ O ₂₁ S	2447	+5
Cys-D3-Cou (33)	CRPRTLHTHRNC-Coumarin	C ₈₂ H ₁₃₃ N ₃₅ O ₂₀ S	1961	+5

Die Strukturen der gelabelten D3-Derivate sind in **Abb. 62** dargestellt. Es konnten alle Derivate in ausreichender Reinheit hergestellt werden. Bei den D3-Peptiden **31** und **32** wurde an die bekannte D3-Sequenz *N*-terminal die Aminosäure Tryptophan gekuppelt. Bei dem Liganden **33** wurde die Coumarineinheit an das *C*-terminale Ende des Peptids geknüpft.

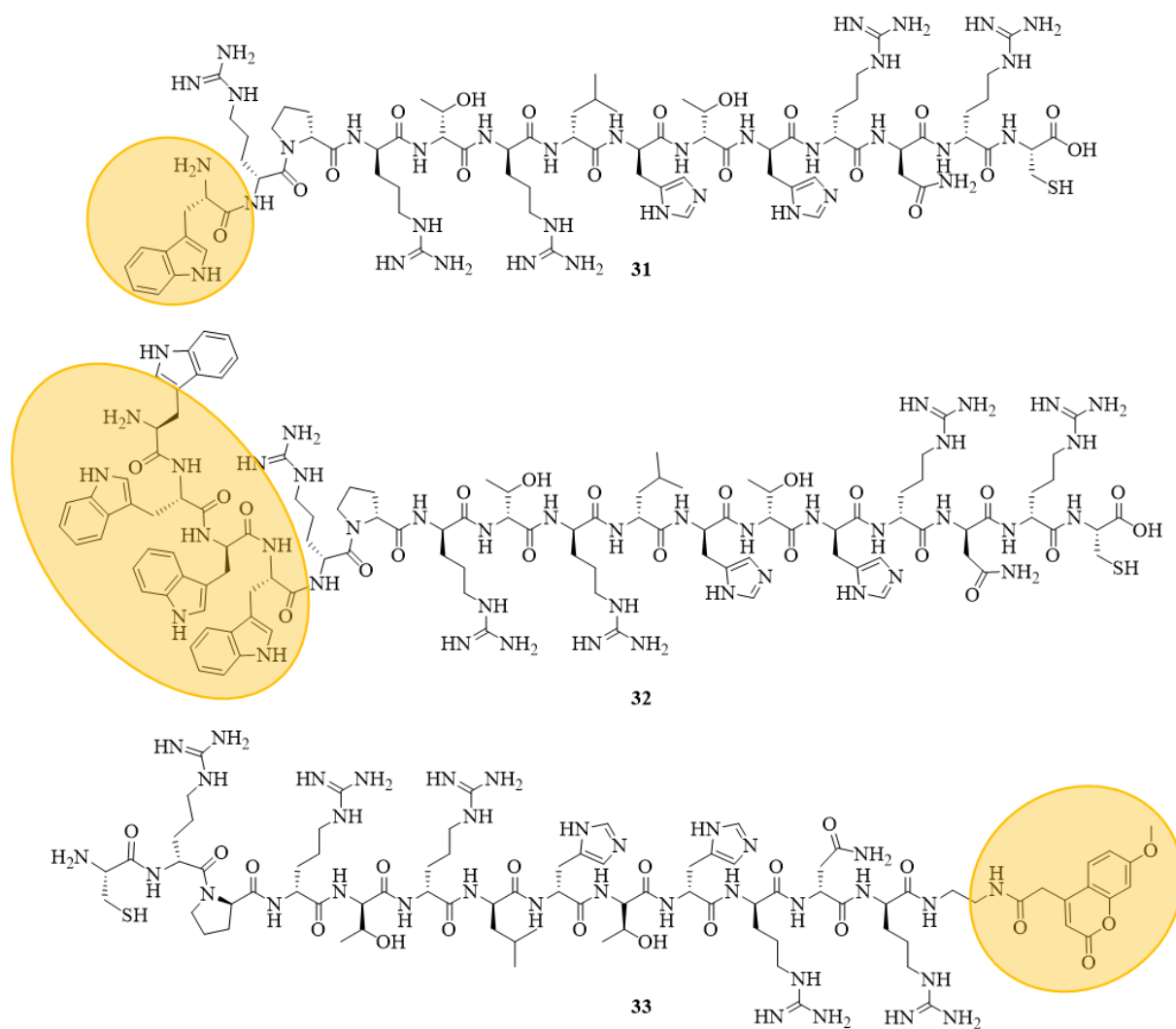


Abb. 62. Strukturen der D3-Derivate (31-33), die photospektrometrisch nachweisbar waren. Die detektierbaren funktionellen Gruppen sind gelb markiert.

Die neuen D3-Peptide konnten nun auf ihre UV- Aktivität hin untersucht werden. Die ermittelten Absorptionsmaxima in den UV/Vis-Spektren lagen bei dem Peptid **32** (Trp-D3-Cys) bei $\lambda = 280$ nm, bei Verbindung **33** (Cys-D3-Coum) bei $\lambda = 328$ nm.

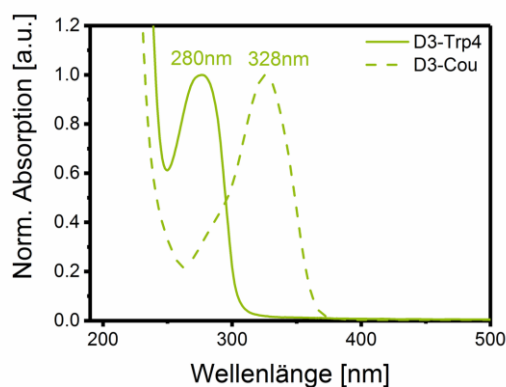


Abb. 63: Normiertes UV/Vis-Extinktionsspektrum von D3_5+ mit Tryptophan bzw. Coumarin.^[178]

Die Ligandendichte auf der Goldnanopartikeloberfläche konnte anschließend durch eine indirekte Bestimmung errechnet werden. Hierfür wurden die Liganden auf die Partikeloberfläche immobilisiert und die hergestellten Konjugate (**31**, **32** und **33**) zentrifugiert (1 h bei 7 °C, 100 000 g). Die noch freien ungebundenen Liganden im Überstand konnten spektrometrisch gegen eine Kalibrierung der reinen Ligandenlösung quantifiziert werden.^[178]

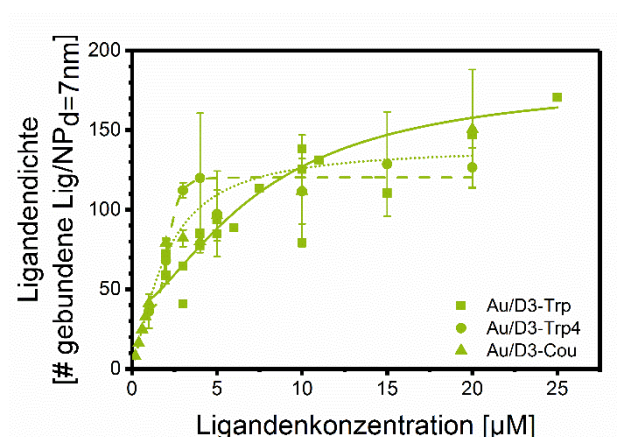


Abb. 64: Bestimmung der Ligandendichte mittels gelabelter D3-Derivate (Verbindungen **31**, **32**, **33**) auf Goldnanopartikel.^[178]

Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die unterschiedlichen Reste (Coumarin, Tryptophan, bzw. Polytryptophan) durch ihre Strukturen die Ligandeneigenschaften veränderten und dadurch die Konjugation der Liganden auf die Oberfläche beeinflussten. Trp-D3-Cys (**31**) war der Verbindung D3_5+ (**28**) strukturell am ähnlichsten. Im Folgenden wurde nur mit den Messresultaten von Trp-D3-Cys gearbeitet. Somit konnten Rückschlüsse auf die Konjugationsergebnisse von D3_5+ gezogen werden.

In den Funktionalitätstests wurden 418 Liganden pro Nanopartikel eingesetzt, von denen ca. 126 an die Oberfläche binden konnten. Bei einem Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis von 125 Liganden konjugierten nur etwa 64 der eingesetzten Liganden an die Oberfläche der Nanopartikel. Bei einem zu geringen Verhältnis (13 Liganden/NP) konnte die Anzahl an ungebundenen Liganden im Überstand nicht mehr detektiert werden, da die Nachweisgrenze des UV/Vis-Spektrometers unterschritten wurde. Die nachweisbare Konzentration des Liganden **31** lag durch den niedrigen Extinktionskoeffizienten bei 1.8 µM.^[178]

In **Tab. 5** werden die eingesetzten Ligandenkonzentrationen, das dementsprechende Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis und die Anzahl der Liganden, die auf die Nanopartikeloberfläche binden konnten, dargestellt.

Tab. 5: Übersicht der eingesetzten Liganden-zu-NP-Menge, der max. Anzahl an konjugierten Liganden und der Nettoladung von Au/Trp-D3-Cys (n.d. = nicht detektierbar).^[178]

	Konzentration [μM]	Liganden-zu-NP-Verhältnis [#/NP]	Max. Anzahl der Liganden zur Oberflächensättigung [#/NP]	Gebundene Liganden [#/NP]	Nettoladung der Konjugate
Trp-D3-Cys	10	418	183 ± 21	126	kationisch
	3	125	183 ± 21	64	kationisch
	0.3	13	183 ± 21	n.d.	anionisch

Im Vergleich zu chemisch hergestellten Goldnanopartikeln ist die mögliche Ligandenanzahl der immobilisierten Liganden pro Nanopartikel bei Verwendung von lasergenerierten Nanopartikeln wesentlich höher. So konnten Gao *et al.* nur 10 Liganden pro Nanopartikel (chemisch hergestellte NPs) immobilisieren, obwohl die dort verwendeten Partikel wesentlich größer waren ($d = 22 \text{ nm}$).^[172,179] Die in dieser Arbeit hergestellten Konjugate besaßen eine hohe lokale Ligandenkonzentration auf sehr kleinen Goldnanopartikelträgern.^[179] Zusätzlich mussten keine Liganden zur Herstellung der gewünschten Konjugate ausgetauscht werden, so dass eine vollständige und reine monofunktionale Schicht aus den gewünschten Liganden auf der Oberfläche gewährleistet werden konnte. Auch konnte auf eine Zugabe von möglicherweise toxischen Konjugatstabilisatoren verzichtet werden, da die untersuchten Konjugate eine ausreichende Stabilität aufwiesen.

Um sicherzustellen, dass ein Maximum an Liganden auf der Goldnanopartikeloberfläche gebunden hatte, wurde in den folgenden Tests ein 418:1 Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis verwendet. Bei diesen hohen Konzentrationen waren jedoch auch freie Liganden in Lösung vorhanden, die einen Einfluss auf die Ergebnisse bei den Experimenten genommen haben.^[179]

Bereits visuell zeigten die reinen Nanopartikel abweichende Eigenschaften zu den D3_5+-Konjugaten (**Abb. 65**). In TEM-Bildern wurde deutlich, dass sich die reinen Goldnanopartikel bevorzugt zu langen, netzartigen Ketten formatierten. Die Konjugate (Au/D3_5+) hingegen lagerten sich eher zu kleinen Gruppen an.

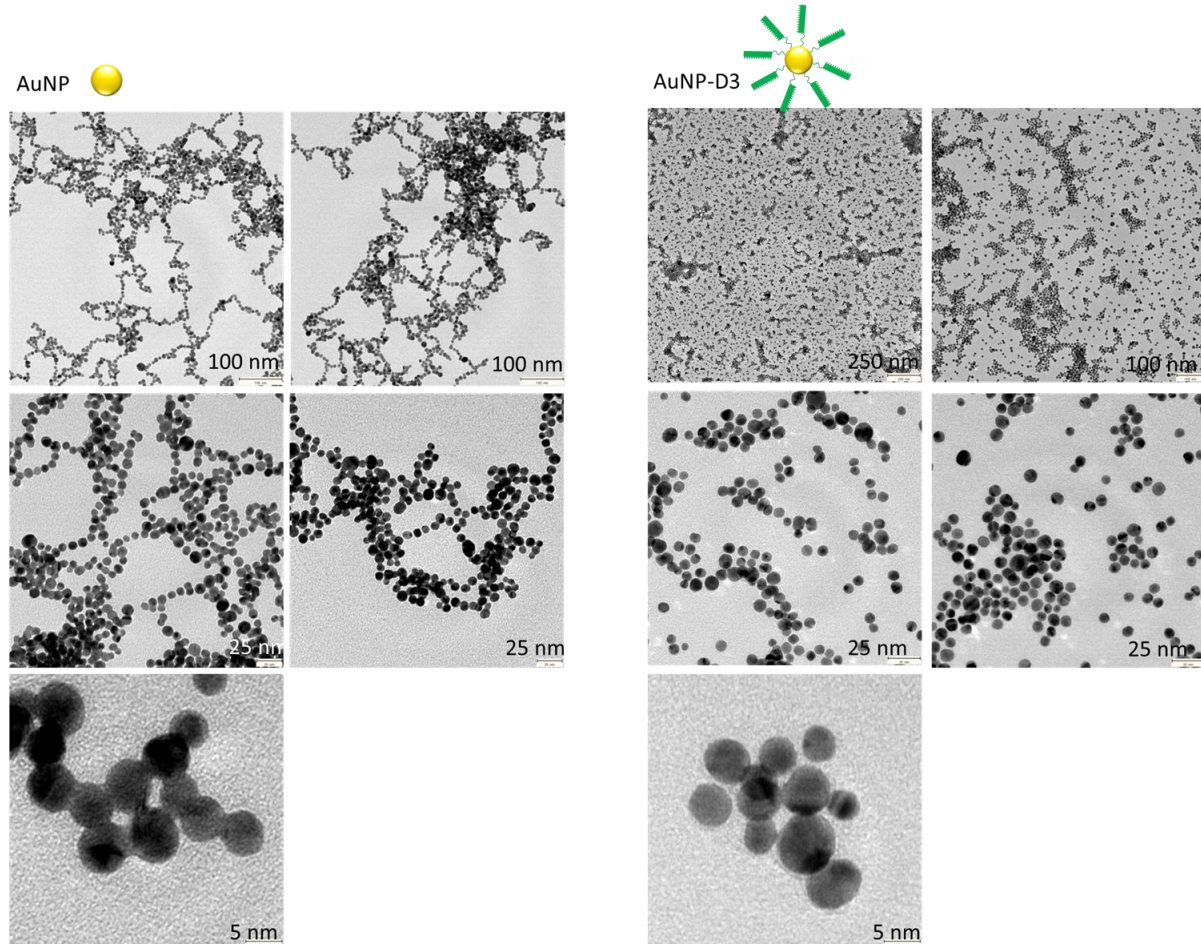


Abb. 65: TEM-Bilder von reinen Goldnanopartikeln und Nanopartikeln mit D3_5+ immobilisiert.^[178,179]

3.1.4 Wirkung der Au/D3-Derivate auf A β (1-42)

In diesem Kapitel sind die Ergebnisse der Untersuchungen von D3-Derivaten in Lösung und auf Goldnanopartikeln immobilisiert zusammengefasst. Im Fokus lag die inhibierende Wirkung der D3-Liganden auf die Fibrillenbildung von A β (1-42). Die Einflüsse der Liganden auf unterschiedliche A β Spezies konnten in verschiedensten hier angewandten Methoden untersucht werden.

Zuerst wurden Au/D3_5+-Konjugaten mit und ohne Inkubation von A β mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Die räumliche Anordnung der Partikel untereinander veränderte sich bei Zugabe von A β . Das Peptid selbst bildete einen Film aus, in dem sich die Konjugate anlagerten. Der Inter-Partikelabstand (IPD) wurde anhand der Bilder ermittelt und bestätigte diese Beobachtungen. Die Auswertungen in **Abb. 66** lassen vermuten, dass sich A β an die Oberfläche der Nanopartikel anlagerte und sich somit der Nanopartikelabstand vergrößerte.^[179]

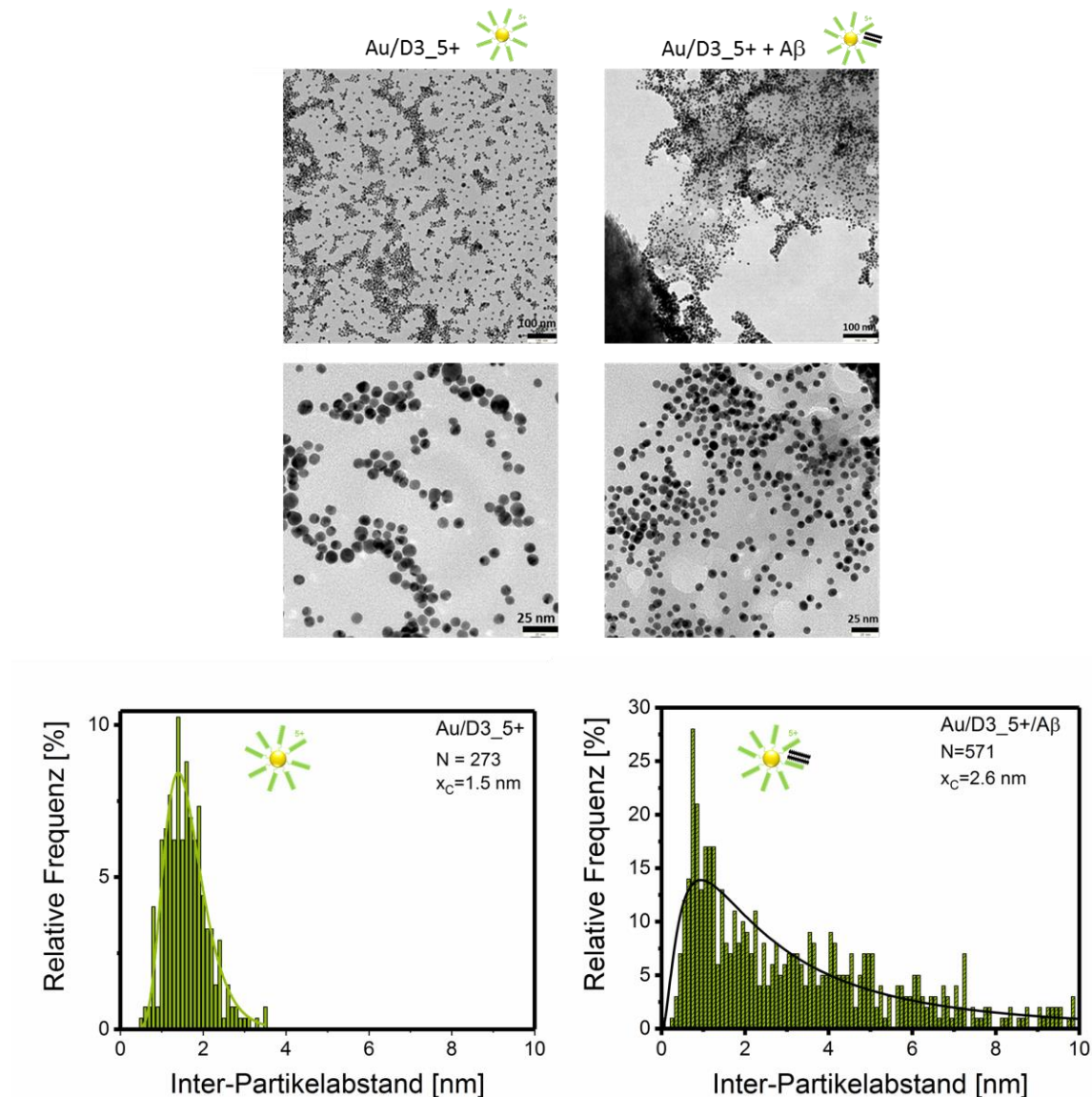


Abb. 66: Oben: TEM-Aufnahmen von Konjugaten (Au/D3_5+) ohne (links) und mit A β inkubiert (rechts). Unten: Verteilung der Inter-Partikelabstände von Au/D3_5+ ohne (links) und mit A β (rechts).^[178,179]

Wie in **Abb. 59** gezeigt, stieg der hydrodynamische Durchmesser der Partikel, sobald diese mit D3-Derivaten immobilisiert wurden. Wurde zusätzlich A β ($c(\text{A}\beta) = 10 \mu\text{M}$) zu den Konjugaten gegeben, konnte ein stärkerer Anstieg des hydrodynamischen Durchmessers in ADC-Experimenten beobachtet werden. Dies bestätigte die vorherigen Beobachtungen bei den TEM-Bilder: A β -Fibrillen interagierten mit den Konjugaten, bzw. die Fibrillen lagerten sich an die D3-Liganden an und bewirkten dadurch eine Partikelagglomeration (**Abb. 67**).

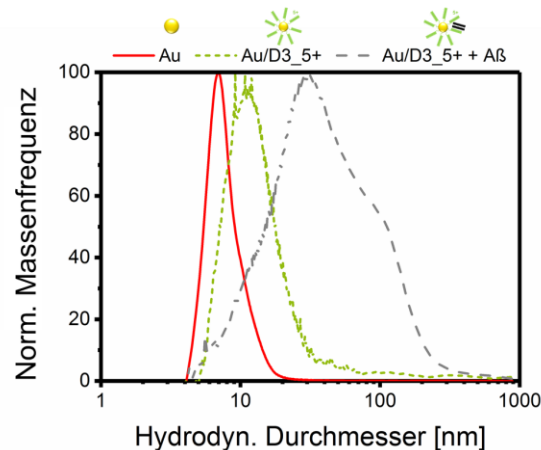


Abb. 67: Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers von reinen Goldnanopartikeln im Vergleich zu Au/D3_5+ und Au/D3_5+ mit A β mittels ADC-Untersuchungen ($c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{D3}_5+) = 10 \mu\text{M}$).^[178]

Weiter wurde der hydrodynamische Durchmesser der Proben mit Hilfe von DLS-Messungen untersucht. Auch hierbei konnte ein Anstieg des Durchmessers bei den Proben Au/D3_5+ mit A β beobachtet werden. Messungen des Zetapotentials von Goldnanopartikeln mit immobilisiertem D3_5+ zeigten zusätzlich eine Verringerung in der Wanderungsgeschwindigkeit im angelegten elektrischen Feld, sobald die Partikel mit A β inkubiert wurden (**Abb. 68b**). Dadurch verfestigte sich die Annahme, dass das Alzheimerpeptid an die D3-Konjugate binden konnte. Die Selektivität der D3-Peptide zu A β blieb durch die Immobilisierung auf Nanopartikel erhalten.

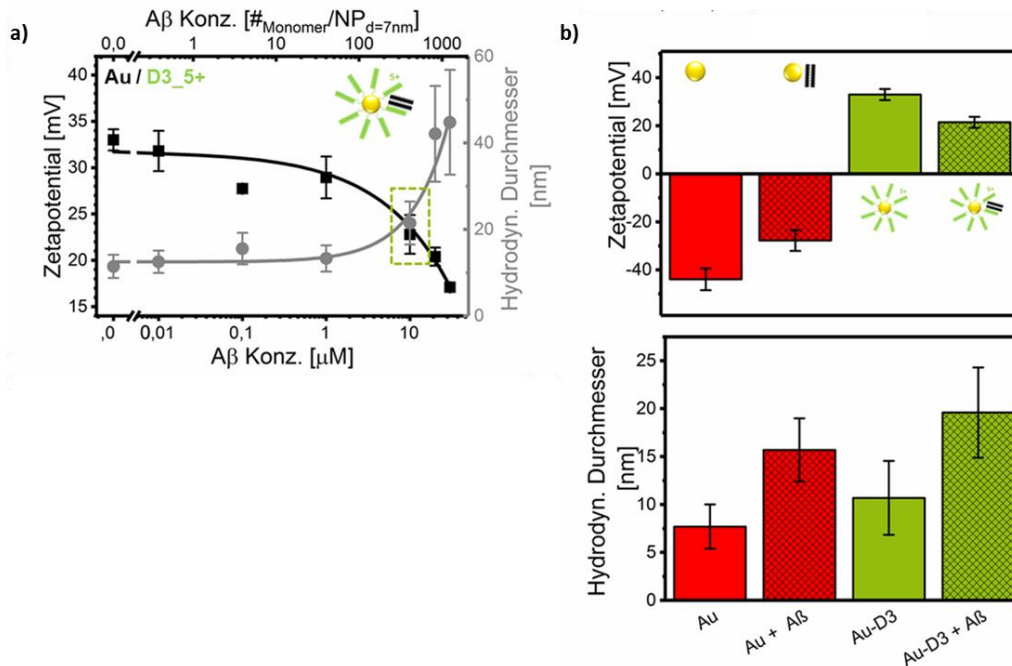


Abb. 68: Ergebnisse der Titration von Aβ zu Au/D3_5+ (a). Grünes Feld markiert die Ergebnisse aus (b): Zetapotentialmessungen der Interaktion von reinen AuNPs und Au/D3_5+ mit Aβ (rechts oben) und Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers der Partikel mittels DLS (rechts unten).^[179]

Mit einer Titration von Aβ zu den Liganden- oder Konjugatlösungen konnte der Nanopartikeldurchmesser erhöht und eine gleichzeitige Abnahme des Zetapotentials beobachtet werden. Allerdings lagerte sich auch bei den ligandenfreien Goldnanopartikeln Aβ an die Oberfläche der Partikel an (**Abb. 68b**), was auf eine unspezifische Wechselwirkung zurückzuführen ist. Mirsadeghi *et al.* beschrieben, dass sich Aβ auf der Oberfläche von reinen Goldnanopartikeln anlagern und eine Proteincorona ausbilden kann.^[182] Der Anstieg des hydrodynamischen Durchmessers bei reinen Goldnanopartikeln ist dementsprechend in diesen Experimenten auf die Ausbildung der Aβ-Proteincorona zurückzuführen.

Die Ergebnisse der Affinitätsuntersuchungen und die daraus resultierenden Dissoziationskonstanten (K_D) der Proben zu dem Aβ-Peptid werden in **Abb. 69** dargestellt. Um die Zahl der ungebundenen Liganden im Überstand zu reduzieren, wurde in den Untersuchungen ein geringeres Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis gewählt. Es wurde ein fluorophorgelabeltes Aβ (Aβ-FITC) eingesetzt, zu den vorgelegten Proben (AuNP, D3_5+ und AU/D3_5+) pipettiert und jeweils die Fluoreszenz gemessen. Eine Erniedrigung des gemessenen Fluoreszenzsignals bedeutete, dass sich Aβ-FITC an Goldnanopartikel, an die Liganden oder die Konjugate anlagerte und somit das Fluoreszenzsignal durch Bildung eines Komplexes aus Aβ mit den Substanzen gequencht wurde. Die ermittelte Dissoziationskonstante der freien Liganden zu Aβ

(D3_5+) lag bei 1906 nmol/L. Im Vergleich zu dem K_D -Wert für die Konjugate (271 nmol/L, bezogen auf den Liganden) war der Wert der freien Liganden demnach bis zu 7-fach höher. Die Affinität zu A β wurde durch die Immobilisierung der Liganden auf Gold signifikant gesteigert. Auch die reinen Goldnanopartikel unterdrückten die Fluoreszenz von FITC, die Dissoziationskonstante von freien Goldnanopartikeln (2.17 nmol/L) im Vergleich zu den Konjugaten (2.05 nmol/L) war allerdings nahezu identisch.^[179]

Um einen möglichen Einfluss auf das Fluoreszenzsignal durch die Oberflächenplasmonenresonanz von Goldnanopartikeln ausschließen zu können, wurden statt der verwendeten Goldnanopartikel zusätzlich Platinnanopartikel eingesetzt und erneut untersucht.

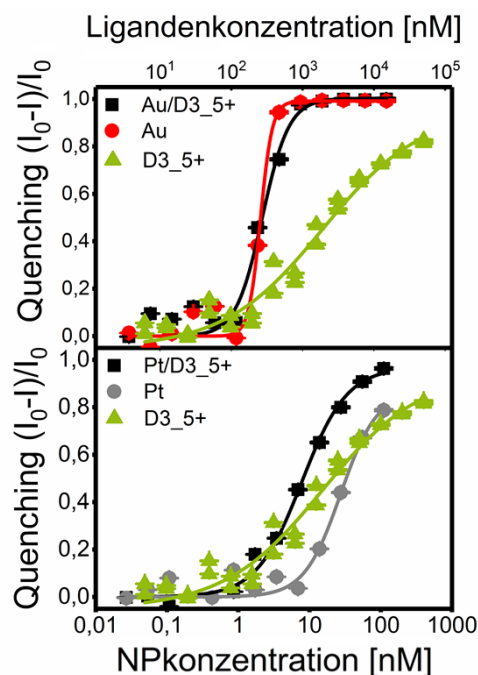


Abb. 69: Ergebnisse des Fluoreszenzquenchingmessungen von FITC-A β : Titration von AuNP und Au/D3_5+(oben) und PtNP und Pt/D3_5+ (unten) zu FITC-A β (125 Lig/NP).^[179]

In **Tab. 6** sind die Dissoziationskonstanten von freien Liganden, Goldnanopartikeln, Goldkonjugaten und deren Platinanaloga gegenübergestellt. Es wurde zum einen jeweils die Affinität zwischen den Liganden und A β (K_D bezogen auf die angewandte Ligandenkonzentration) und zum anderen die Affinität zwischen dem Konjugat und A β (K_D bezogen auf die angewandte Nanopartikelkonzentration) ermittelt.

Tab. 6: Dissoziationskonstanten und Kooperativitätsfaktor von D3_5+, AuNP, Au/D3_5+ und den Platinanaloga mit A β -FITC.^[179]

Ligand	K_D , Lig [nmol/L, angewandt auf D3]	K_D , NP [nmol/L, angewandt auf NP]	Kooperativitäts- faktor n	Korrel. Koeffi- zient, R^2 (Hill fit)
D3_5+ mit A β -FITC	1906 \pm 587	-	0.63 \pm 0.07	0.97
Au/D3_5+ mit A β -FITC	271 \pm 25	2.17 \pm 0.20	2.32 \pm 0.42	0.98
Au mit A β -FITC	-	2.05 \pm 0.11	5.24 \pm 2.01	0.99
Pt/D3_5+ mit A β -FITC	973 \pm 148	7.78 \pm 1.81	1.36 \pm 0.33	0.96
Pt mit A β -FITC	-	27.2 \pm 6.0	1.70 \pm 0.42	0.96

Es wird deutlich, dass die reinen Platinpartikel die FITC-Fluoreszenz weniger unterdrückten als die reinen Goldnanopartikel. Bei einem Vergleich zwischen den reinen Platinpartikeln und den funktionalisierten Platinpartikeln (Pt/D3_5+) wurde die Fluoreszenz der Plantinkonjugate wiederum stärker unterdrückt. Die Dissoziationskonstante war hier um den Faktor 3.5 geringer als bei den reinen Platinpartikeln. Dies ist auf eine stärkere Affinität durch den immobilisierten D3_5+-Liganden zurückzuführen. Da der K_D -Wert bei den freien D3-Liganden immer noch wesentlich höher war als der Wert bei den auf Nanopartikeln immobilisierten Liganden (sowohl AuNP als auch PtNP), war demnach ein kooperativer Effekt zwischen Ligand und Nanopartikel zu beobachten.^[179]

Der Kooperativitätsfaktor n , welcher aus dem Hill-Fit bestimmt werden kann, beschreibt die Bindungsabhängigkeit eines Liganden. Wenn sich Liganden gegenseitig behindern, so dass die übrigen Bindungsplätze mit weniger Affinität besetzt werden können, liegt eine negative Kooperativität ($n < 1$) vor. Wird die Bindung jedoch stärker, also bei einer positiven Kooperativität ($n > 1$), unterstützt die vorherige Bindung eines Liganden die Bindung weiterer Liganden.^[183] Die A β -Nanopartikel-Wechselwirkungen waren stark positiv kooperativ. Dies zeigte, dass sich die A β -Fibrillen unspezifischen auf der Partikeloberfläche ansammeln konnten.

Im nächsten Schritt wurden die Dissoziationskonstanten in Abhängigkeit vom Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis ermittelt. Diese Experimente hatten das Ziel, die spezifischen Wechselwirkungen zwischen den D3-Liganden und dem A β -Peptid herauszufinden. Dementsprechend sollte bei einer hohen Ligandenbeladung der entsprechende K_D -Wert sinken. Die Ergebnisse werden in **Abb. 70** gezeigt. Es wurden jeweils 4, 125 und 418 Liganden pro Nanopartikel getestet (Au/D3₄, Au/D3₁₂₅ und Au/D3₄₁₈).

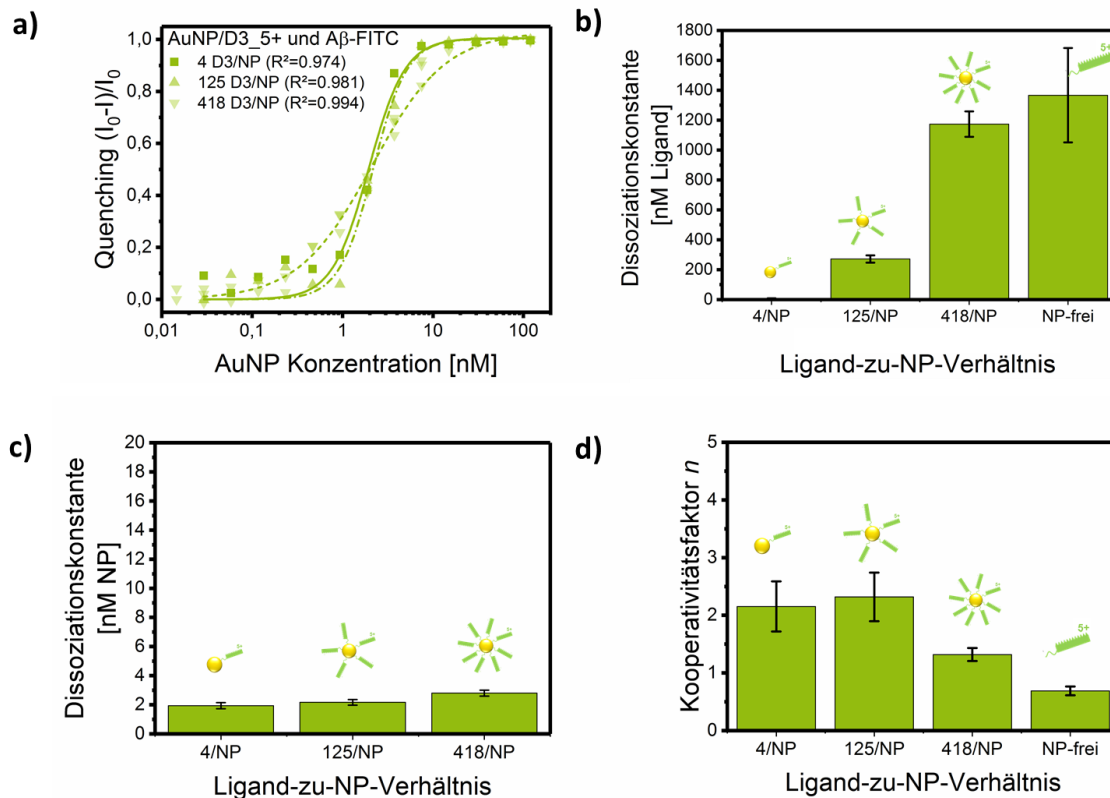


Abb. 70: Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Au/D3₅₊ mit A β -FITC durch Fluoreszenzquenchungsuntersuchungen ($c(\text{A}\beta\text{-FITC}) = 0.125 \mu\text{M}$).^[178]

Entgegen der Erwartungen stieg die Ligandendissoziationskonstante (bezogen auf den Liganden) mit wachsendem Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis an. Eine sehr starke Affinität zwischen den Liganden und A β konnte jedoch bei sehr geringen Liganden auf Nanopartikeln beobachtet werden ($K_D = 8 \text{ nmol/L}$). Der Kooperativitätsfaktor war bei wenig Liganden auf Nanopartikeln (4 Lig/NP) und mittlerem Ligandenverhältnis (125 Lig/NP) positiv. Sobald sich das A β -Peptid an die D3-Liganden anlagerte, förderte dies demnach die Bindung von weiterem A β an das Konjugat. Bei einer hohen Ligandendichte auf dem Nanopartikel (418 Lig/NP) war eine negative Kooperativität zu beobachten. Die Liganden, welche schon dicht aneinander auf der Oberfläche immobilisiert vorlagen, behinderten demnach die A β -Anlagerungen, so dass die

noch freien Bindungsstellen von weiterem A β weniger stark besetzt werden konnten. Die gegenseitige räumliche Behinderung der Liganden erklärt somit auch die niedrigere Affinität zu A β bei hohen Ligandenkonzentrationen auf Nanopartikeln.

Die Dissoziationskonstante von dem dicht gepackten Konjugat (Au/D3₄₁₈) lag zwischen dem K_D -Wert des Konjugats mit 125 Liganden und dem freien D3_5+-Liganden. Da bei diesem Konjugat (Au/D3₄₁₈) insgesamt nur ca. 30 % der eingesetzten Liganden an die Oberfläche binden konnten, befand sich der Rest an Liganden frei in Lösung. Demzufolge lag der ermittelte K_D -Wert auch zwischen den freien Liganden und nahezu vollständig gebundenen Liganden (Au/D3₁₂₅).

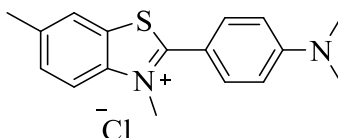
Tab. 7: Dissoziationskonstanten und Kooperativitätsfaktoren von D3_5+, Au/D3_5+ und reinen Goldnanopartikeln mit A β -FITC in Abhängigkeit unterschiedlicher Ligandenkonzentrationen ($c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{Ligand}) = 0.1 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$).

Ligand	K_D, Lig [nmol/L, angewandt auf D3]	K_D, NP [nmol/L, angewandt auf NP]	Kooperativitäts- faktor <i>n</i>
Au/D3_5+ (0.1 μM)	7.8	1.94	2.16
Au/D3_5+ (3 μM)	271	2.17	2.32
Au/D3_5+ (10 μM)	1174	2.81	1.32
AuNP	-	2.05	5.24
D3_5+ (10 μM)	1906	-	0.63

3.1.4.1 ThT-Messungen

Die Verbindung 3,6-Dimethyl-2-(4-dimethylaminophenyl)-benzothiazoliumchlorid (**34**), auch Thioflavin T (ThT) genannt, ist eine Substanz, die durch Bindung an amyloide Proteinstrukturen fluoresziert.^[184,185]

Die Verbindung besteht aus einer Benzothiazol-Einheit und einer Benzoamin-Einheit, welche über eine kovalente, drehbare Bindung miteinander verknüpft sind.



34

Abb. 71: Struktur von Thioflavin T (34).

Dieser amyloidspezifische Fluoreszenzfarbstoff kann sowohl *in vivo* als auch *in vitro* angewandt werden. Durch Bindung an amyloide Fibrillen verschiebt sich das Exzitations- und das Emissionsmaximum hin zu größeren Wellenlängen (freies ThT: $\lambda_{em} = 430$ nm, $\lambda_{ex} = 342$ nm, gebundenes ThT: $\lambda_{em} = 482$ nm, $\lambda_{ex} = 442$ nm). ThT besitzt eine Affinität zu Fibrillen im niedrigen mikromolaren Bereich und bindet an das β -cross-Motiv. Durch diese Bindung kann eine Drehbewegung innerhalb des Moleküls nicht mehr stattfinden, wodurch die Energie in Form von Fluoreszenzemission abgegeben wird und dadurch eine erhöhte Fluoreszenz gemessen werden kann.

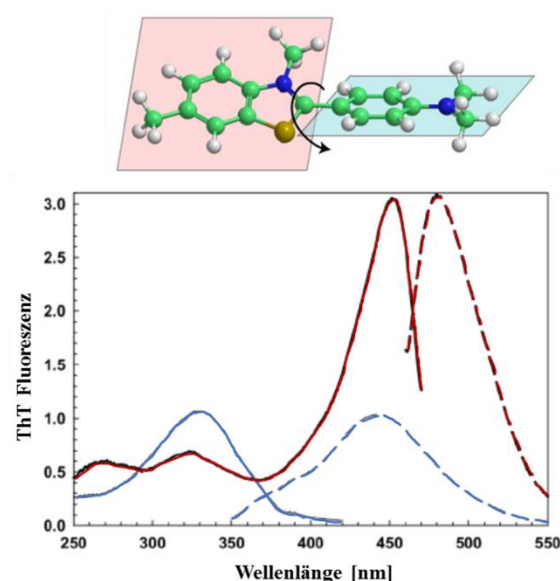


Abb. 72: Fluoreszenzspektrum von Thioflavin T: gebunden an A β (1-40) in rot und freies ThT in blau (jeweils Absorption durchgezogene Linie und Emission gestrichelte Linie).^[186,187]

Durch das gemessene Emissionsspektrum kann darüber die Menge des gebundenen Farbstoffs bestimmt werden. ThT bindet ausschließlich an amyloide Fibrillen oder größere Oligomere, die in der β -Faltblattkonformation vorliegen, nicht jedoch an amorphe Aggregate oder niedermolekulare Formen mit α -Helixstruktur (Monomere oder kleine Oligomere).^[187] In den durchgeführten Untersuchungen wurde demnach festgestellt wie viele A β -Fibrillen sich bei einer Inkubationszeit von fünf Tagen bilden konnten. Besaßen die Liganden, welche mit A β inkubiert wurden, inhibierende Eigenschaften auf die Fibrillenbildung, konnte dies anhand der reduzierten Menge der daraufhin gebildeten Fibrillen nachgewiesen werden.

In **Abb. 73** wird die Kinetik der A β -Aggregation dargestellt. Hierfür wurde der Aggregationsprozess von A β (1-42) in sechs verschiedenen Proben unter identischen Bedingungen über einen Zeitraum von drei Tagen bei 37 °C untersucht. Das verwendete A β wurde zuvor mit Hilfe von HFIP monomerisiert und zur Vermeidung der unkontrollierten Fibrillenbildung in DMSO gelagert.^[188,189]

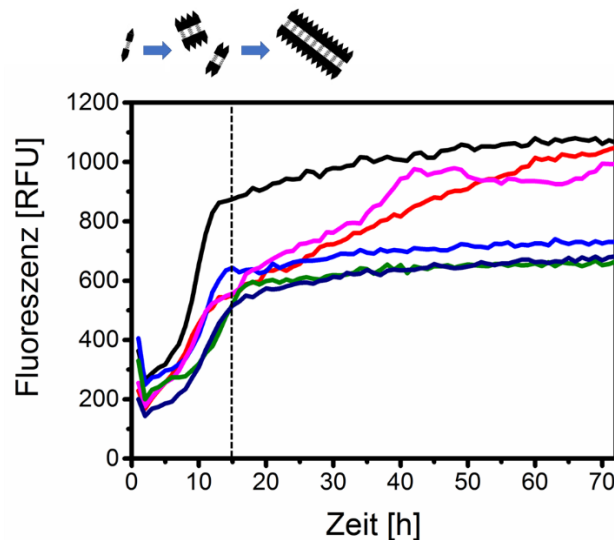


Abb. 73: Aggregationskinetik von 10 µM A β (1-42) bei 37 °C, gemessen über drei Tage.^[179]

Zunächst konnte in der Zeit von 0 bis 5 h die sogenannte „lag phase“ beobachtet werden, gefolgt von einem starken Fluoreszenzanstieg. Nach dieser exponentiellen Phase wurde die maximale Fluoreszenzintensität (Plateauphase) erreicht.^[190]

Anschließend wurden die Liganden D3_5+ (**28**), D3_8+ (**29**) und D3_10+ (**30**) und die entsprechenden Goldkonjugate mittels ThT-Untersuchungen auf ihre aggregationsinhibierenden Eigenschaften untersucht. Um eine Eigenfluoreszenz der Liganden oder eine Wechselwirkung zwischen Liganden und Thioflavin T auszuschließen, wurden die Proben zunächst einzeln ohne A β -Peptid vermessen (**Abb. 74** und **Abb. 75**).

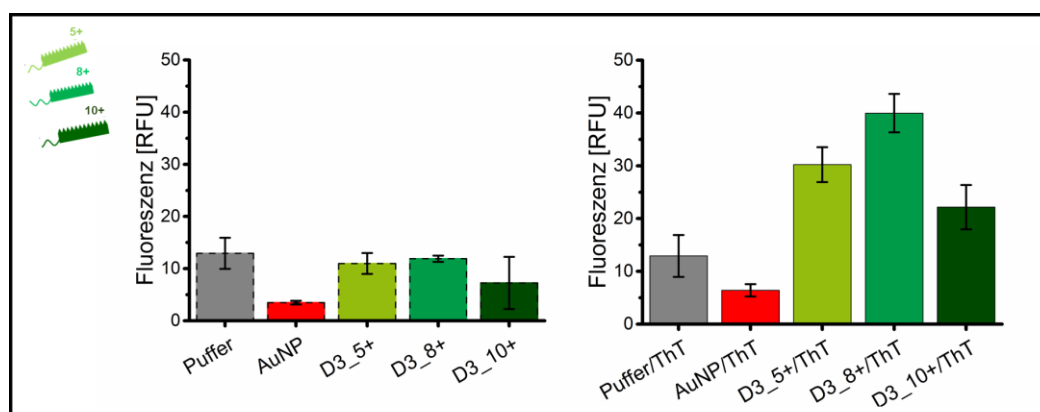


Abb. 74: Ergebnisse der Eigenfluoreszenzuntersuchungen von reinen AuNPs und der Liganden D3_5+, D3_8+ und D3_10+ ohne ThT (links) und mit ThT (rechts).^[179]

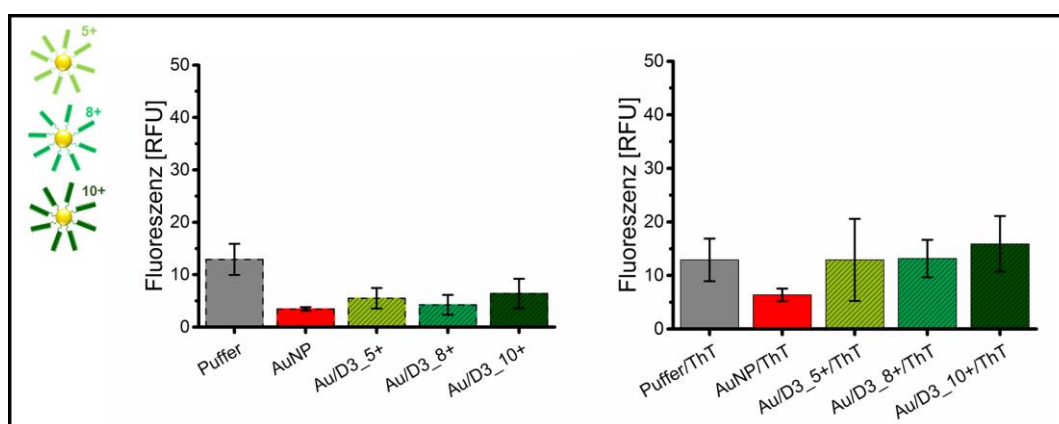


Abb. 75: Ergebnisse der Eigenfluoreszenzuntersuchungen von reinen AuNPs und der Konjugate Au/D3_5+, Au/D3_8+ und Au/D3_10+ ohne ThT (links) und mit ThT (rechts).^[179]

Sowohl die freien Liganden (**28**, **29** und **30**) als auch deren Konjugate zeigten keinerlei Eigenfluoreszenz oder Wechselwirkungen mit dem Thioflavin T-Farbstoff. Ebenfalls zeigten die reinen ligandenfreien Goldnanopartikel keine Auffälligkeiten oder unerwünschten Wechselwirkungen in den ThT-Experimenten.

Des Weiteren wurde die Wirkung der Liganden auf die A β -Inhibierung bei einem 6-fachen Überschuss der jeweiligen Liganden untersucht. Hierzu wurden einerseits die freien D3-Derivate, als auch deren Konjugate auf Goldnanopartikeln getestet. Es wurde eine Ligandenkonzentration von 60 μ M verwendet. Die Goldkonzentrationen variierten: hier wurde sowohl eine Konzentration von 300 μ g/mL, als auch eine hohe Konzentration von 900 μ g/mL analysiert. Die A β -Konzentration lag bei 10 μ M. In **Abb. 76** sind die Ergebnisse der ThT-Experimente dargestellt. Die Werte sind in Prozent, bezogen auf die A β -Kontrolle (= 100 %) angegeben.

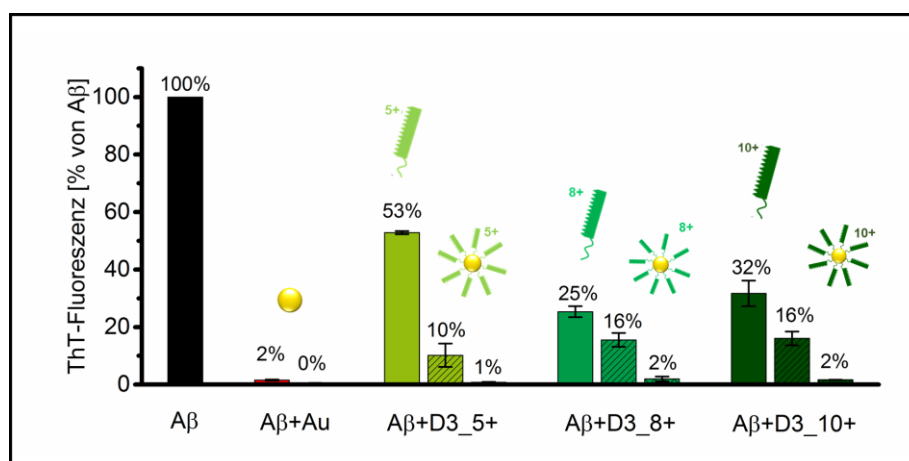


Abb. 76: Ergebnisse der ThT-Experimente von 10 μ M A β (1-42) mit reinen Goldnanopartikeln und Nanopartikeln mit D3-Derivaten (28, 29, 30). Die untersuchten Proben sind in Gruppen nach den unterschiedlichen Liganden unterteilt. Der linke Balken repräsentiert dabei jeweils die freien Liganden (60 μ M), mittlere Balken die Liganden mit AuNP ($c(\text{AuNP}) = 300 \mu\text{g/mL}$) und rechte Balken die Liganden mit höherer AuNP-Konzentration ($c(\text{AuNP}) = 900 \mu\text{g/mL}$) (Inkubationszeit: 5 Tage bei 37 °C und 650 rpm).^[179]

Die reinen Goldnanopartikel schienen einen Einfluss auf die Fibrillenbildung zu nehmen, allerdings resultierten die Ergebnisse aus unspezifischen Wechselwirkungen zwischen der Partikeloberfläche und den A β -Fibrillen. Oberflächen von lasergenerierten Goldnanopartikeln wiesen durch den Herstellungsprozess eine partielle Oberflächenoxidation auf und waren somit negativ geladen. Der Hauptteil der Partikeloberfläche war allerdings nicht oxidiert und dadurch ungeladen, weswegen diese Bereiche hydrophobe Interaktionen mit negativ geladenen A β -Fibrillen eingehen konnten. Diese unspezifischen Wechselwirkungen bestätigten sich auch bei Ergebnisse aus Experimente von Liao *et al.*, in denen sie nachwiesen, dass negativ geladene Nanopartikel die Aggregation von A β inhibieren konnten.^[167] So ist zu vermuten, dass die Nanopartikel an den Fibrillen binden und dadurch die Anlagerung von weiteren Monomeren verhindern konnten.

Bei den freien Ligandenderivaten war ein wachsender Inhibierungseffekt zu beobachten, je größer die Liganden-Nettoladung ist. D3_5+ (**28**) besaß eine 5-fach positive Ligandenladung und reduzierte das ThT-Fluoreszenzsignal auf bis zu 53 %. Wurde ein D3-Ligand (D3_8+ oder D3_10+) mit einer höheren positiven Ligandenladung eingesetzt, sank das Fluoreszenzsignal auf bis zu 25 %. Je positiver also die Gesamtladung eines Liganden, desto stärker waren die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den negativen A β -Fibrillen und den kationischen D3-Liganden.^[191]

Wurden die positiv geladenen Liganden jedoch auf Goldnanopartikel immobilisiert, war ein sehr starker Inhibierungseffekt zu beobachten. Die Konjugate reduzierten das Fluoreszenzsignal auf 10-16 %. Da allerdings von den eingesetzten 418 Liganden/Nanopartikel (bei einer Ligandenkonzentration von 60 μ M und Goldnanopartikelkonzentration von 300 μ g/mL) nur ca. 30 % der Liganden an die Nanopartikeloberfläche binden konnten, ist die Inhibierung der getesteten Konjugate signifikant groß.

Bei einer 3-fach höheren Goldnanopartikelkonzentration ($c = 900 \mu\text{g/mL}$), bei der nahezu 100 % der Liganden auf der Oberfläche binden konnten (125 Liganden/NP), zeigten die Untersuchungen eine drastische Senkung des ThT-Fluoreszenzsignals auf 1-2 %.

Durch die Oberflächenplasmonenresonanzabsorption (starke Absorption im Bereich zwischen 500-550 nm) von Gold könnten allerdings Interferenzen bei den Messbedingungen in den ThT-Experimenten (Emissionswellenlänge 490 nm) entstanden sein und somit wären die sehr vielversprechenden Ergebnisse beeinflusst worden. Um dies auszuschließen, wurde das Nanopartikelträgermaterial erneut durch Platin ausgetauscht. Platinnanopartikel wiesen, wie schon aus **Abb. 58c** ersichtlich, im sichtbaren Spektrum keinen SPR-Peak auf.

In **Abb. 77** sind die Ergebnisse der ThT-Experimente mit Platinpartikeln und D3-Liganden in einem Balkendiagramm zusammengefasst.

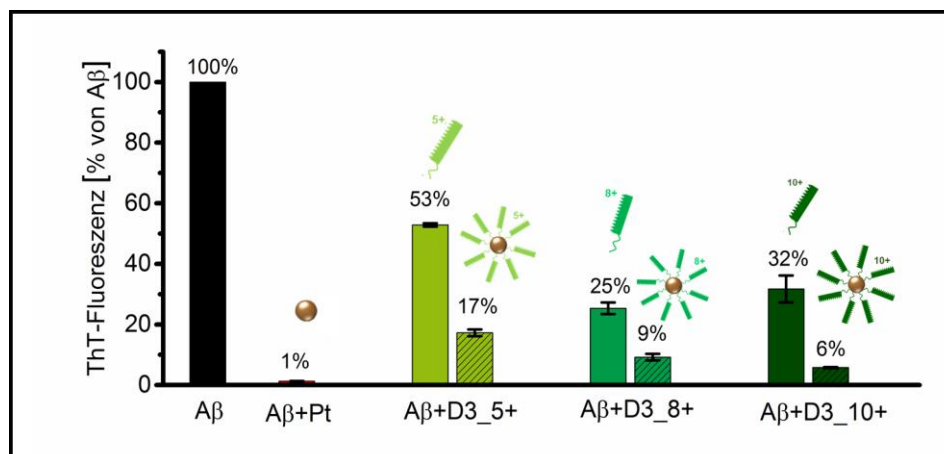


Abb. 77: Ergebnisse der ThT-Experimente von 10 μM A β (1-42) mit reinen Platinnanopartikeln und Nanopartikeln mit D3-Derivaten (28-30). Die untersuchten Proben sind nach den unterschiedlichen Liganden in Gruppen unterteilt. Links sind jeweils die freien Liganden (60 μM), rechts die Liganden mit PtNP ($c(\text{PtNP}) = 333 \mu\text{g/mL}$) dargestellt (Inkubationszeit: 5 Tage bei 37 °C und 650 rpm).

Die Experimente mit Platinnanopartikeln zeigten sehr ähnliche Ergebnisse im Vergleich mit den Goldnanopartikelkonjugaten. Platinpartikel allein besaßen ebenfalls eine negative Partikeloberfläche und wechselwirkten dadurch unspezifisch mit den A β -Fibrillen. Die freien D3-Liganden inhibierten die Fibrillenbildung zwischen 25-53 %, die Konjugate reduzierten das Fluoreszenzsignal je nach Ligand auf 6-17 %. Somit wurde bestätigt, dass eine potenzielle plasmonische Fluoreszenzlöschung der ThT-Emission durch die Goldnanopartikel generell vernachlässigbar war.

Durch eine Immobilisierung der D3-Liganden auf Nanopartikel konnten die Inhibierungseigenschaften in ThT-Experimenten im Gegensatz zu den freien Liganden um den Faktor 50 gesteigert werden.

3.1.4.2 CD-Messungen

Circulardichroismus (CD) ist eine Methode zur Messung der Wechselwirkung von polarisiertem Licht mit optisch aktiven Stoffen (asymmetrische Moleküle) in Lösung. Die spektroskopischen Eigenschaften von Proteinen unterscheiden sich in ihrem gefalteten und ungefalteten Zustand, so dass diese Methode genutzt werden kann, um eine Aussage über den Gehalt an Sekundärstrukturelementen von Proteinen oder Peptiden tätigen zu können.

Es können z.B. Protein-Protein-Interaktionen oder die Konformationsstabilität von Proteinen bestimmt werden. Durch ein CD-Spektrum können in folgenden Bereichen Unterscheidungen getätigt werden:

- ferner UV-Bereich (< 250 nm)
Peptidbindungen: $n \rightarrow \pi^*$ Übergang zentriert um 220 nm
 $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang bei 190 nm
- nahes UV (250 – 300 nm)
aromatische Aminosäurereste: $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang 250 bis 300 nm
(Phe: 255-277 nm; Tyr: 275-282 nm; Trp 290-305 nm)^[192]
Disulfidbrücken: $n \rightarrow \sigma^*$ Übergang ~ 260 nm

Wu *et al.* untersuchten mit Hilfe von CD-Messungen die Konformationsänderungen von Proteinen bei einer Inkubation mit Nanopartikeln.^[193] Es kann folglich eine qualitative Aussage über die Strukturänderung von A β durch funktionalisierte Nanopartikel getroffen werden.

Die Sekundärstrukturen von α -Helix, β -Faltblatt und ungeordneten Strukturen (*random coil*) zeigen einen charakteristischen Verlauf in CD-Spektren. In **Abb. 78** sind die typischen Banden im fernen UV-CD-Spektrum dargestellt.

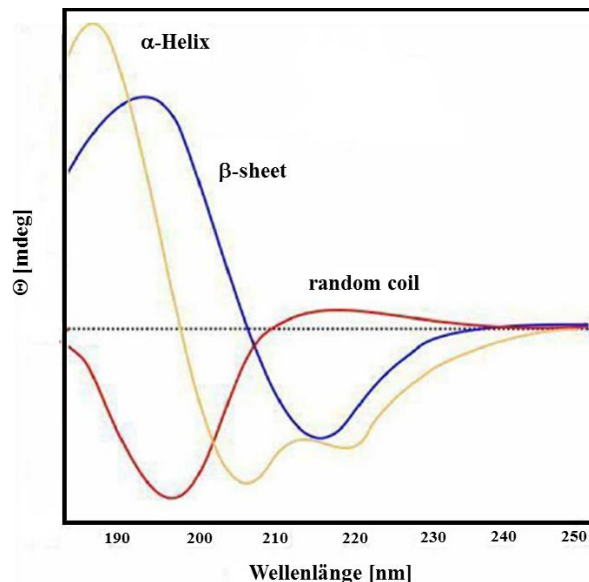


Abb. 78: Charakteristische CD-Spektren der Sekundärstrukturen eines Proteins.^[194]

In diesem Kapitel sind die Ergebnisse über den Einfluss der Liganden und Konjugate auf die Sekundärstruktur des A β -Peptids zusammengefasst.

Zunächst wurde das A β -Peptid (10 μ M) als Referenzprobe vermessen. Hierzu wurde das zuvor monomerisierte Peptid in einem Puffer bei 25 °C über 24 h in einem Thermomixer (650 rpm) inkubiert. Die CD-Messungen erfolgten nach 0 h, 1 h und nach einem Tag Inkubationsdauer.

Abb. 79 zeigt das CD-Spektrum von 10 μ M A β (1-42) als Kontrolle.

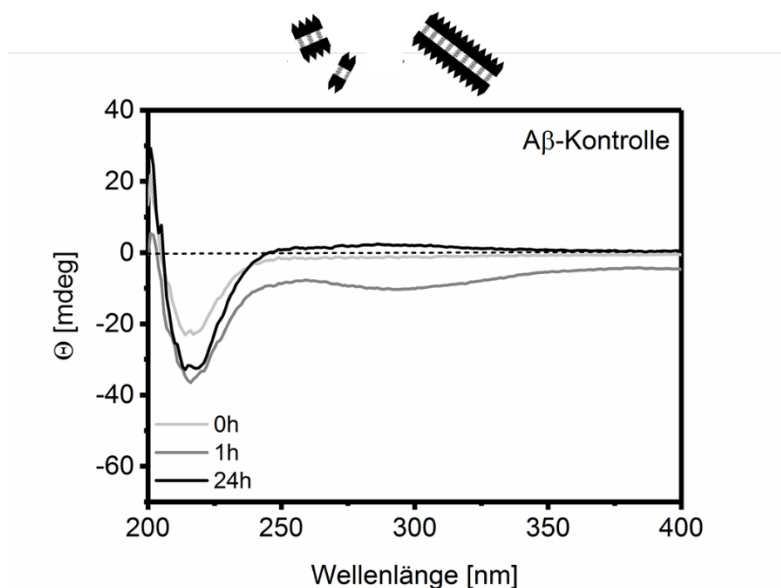


Abb. 79: CD-Spektren von A β (1-42). Die Spektren wurden bei verschiedenen Inkubationszeiten aufgenommen ($c(\text{A}\beta) = 10 \mu\text{M}$).

Peptide weisen allgemein für β -Faltblätter einen negativen Cotton-Effekt bei 220 nm und einen positiven Cotton-Effekt bei 195 nm auf. Sobald A β (1-42) in gepufferte, wässrige Lösung gegeben wurde, lag das Peptid bei den Untersuchungen in seiner β -Faltblattkonformation vor. Die molare Elliptizität steigerte sich ein wenig innerhalb von 24 h auf eine Intensität von ca. -40 deg cm^2/dmol . Der Konformationswechsel von dem ungefalteten monomeren A β (1-42) in die β -faltblattreiche Fibrillenspezies erfolgte demnach sehr schnell.

Ebenfalls wurden CD-Messungen von den reinen Liganden, Goldnanopartikeln und den Liganden auf Goldnanopartikeln ohne A β -Peptid durchgeführt, um mögliche spezifische Banden der potentiellen Inhibitoren aufnehmen zu können (**Abb. 80**).

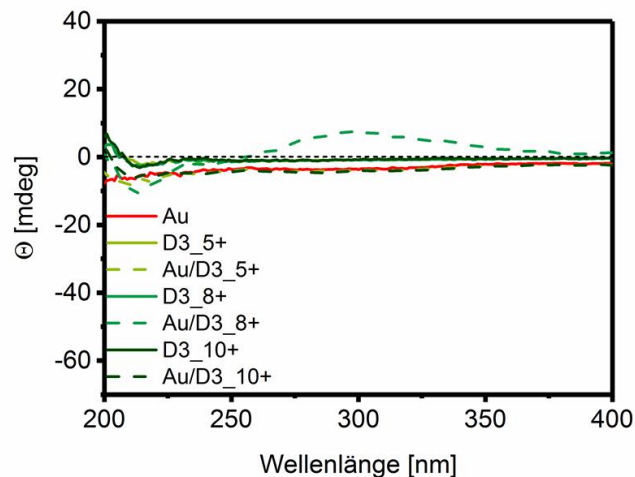


Abb. 80: CD-Spektren der untersuchten Proben ohne Zugabe von A β (1-42).

Die eingesetzten D3-Derivate zeigten keine besonders ausgeprägten Banden in CD-Spektren. Bei reinen Goldnanopartikeln konnte keine charakteristische Bande detektiert werden. Die hergestellten Konjugate Au/D3_5+ und Au/D3_10+ waren ebenfalls unauffällig. Das Au/D3_8+-Konjugat zeigte einen sehr schwach positiven Cotton-Effekt bei 300 nm.

Für die Auswertung der Inhibierungsexperimente wurden die aufgenommenen Ligandenspektren (bzw. Konjugatspektren) von den entsprechenden A β -Ligandenspektren (A β -Konjugatspektren) subtrahiert. Ebenfalls wurde in jedes Spektrum zum Vergleich ein CD-Spektrum von A β (1-42) ohne Ligand nach 24 h Aggregationszeit abgebildet. Zunächst wurde der mögliche Einfluss von Goldnanopartikel auf die A β -Sekundärstruktur untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die reinen Goldnanopartikel keine Wirkung auf die Fibrillenbildung von A β (1-42) besaßen, da auch nach 24 h Inkubationszeit die charakteristische Bande bei 220 nm vorhanden war (**Abb. 81**). Die Sekundärstruktur wurde durch die Anwesenheit der Nanopartikel nicht verändert.

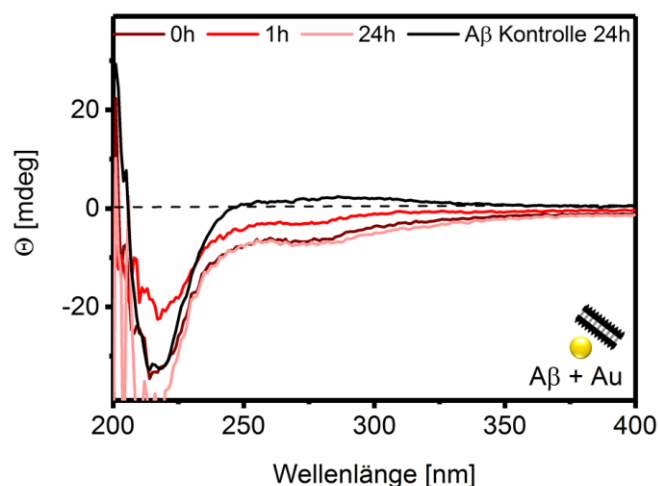


Abb. 81: CD-Spektren über 24 h von A β (schwarz) und mit Goldnanopartikeln inkubiert ($c(\text{A}\beta) = 10 \mu\text{M}$; $c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$).

Darauffolgend wurde die Wirkung des D3-Liganden **28** auf die Sekundärstruktur des A β -Peptids untersucht. **Abb. 82** zeigt sowohl die Wirkung des freien Ligand D3_5+ (**Abb. 82 oben**) als auch die Wirkung des Konjugats Au/D3_5+ (**Abb. 82 unten**) auf die β -Faltblattkonformation von A β . Der freie Ligand konnte die typische Bande für die Faltblattkonformation moderat auflösen. Schon nach 24 h Inkubationszeit war der negative Cotton-Effekt bei 220 nm fast vollständig verschwunden. Auch schienen sich keine anderen Strukturen oder Komplexe zwischen dem Peptid und dem Liganden gebildet zu haben. Wurde der Ligand auf Goldnanopartikeln immobilisiert, destabilisierte das Konjugat noch schneller die β -Faltblattkonformation von A β . Auch hier konnte bereits nach Zugabe der Ligandenprobe zu dem A β -Peptid sofort ein Rückgang der negativen Bande bei 220 nm beobachtet werden. Die Immobilisierung des Liganden auf Nanopartikel beschleunigte demnach die Konformationsänderung.

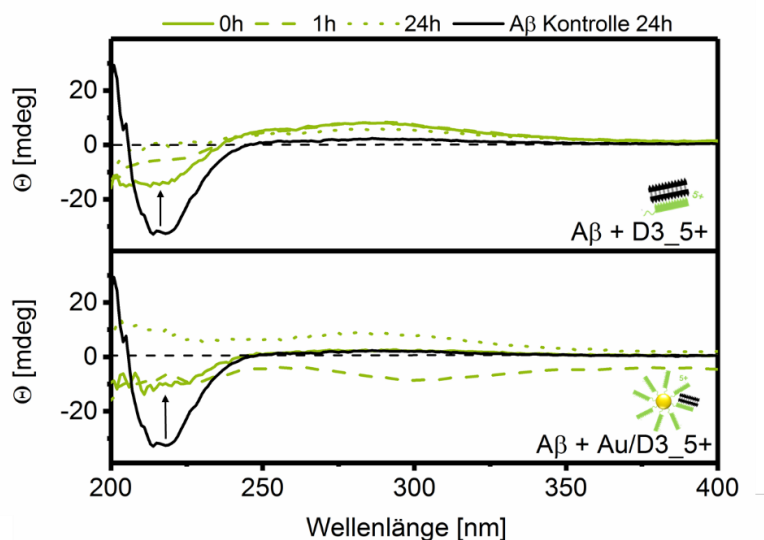


Abb. 82: CD-Spektren über 24 h von A β (schwarz) und mit D3_5+ (oben) und Au/D3_5+ (unten) inkubiert ($c(\text{A}\beta) = 10 \mu\text{M}$; $c(\text{Ligand}) = 10 \mu\text{M}$; $c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$).

Untersuchungen mit dem Liganden D3_8+ (**29**) zeigten, dass dieser die β -Faltblattstruktur von A β schon bereits bei Zugabe zu der A β -Lösung destabilisierte. Der Einfluss des freien, bzw. immobilisierten Liganden auf die Konformation von A β ist in **Abb. 83** abgebildet. Im Vergleich zu D3_5+ wirkte der Ligand **29** noch effektiver. Durch Immobilisierung auf Goldnanopartikel wurde die Wirkungsweise nicht beeinflusst, da direkt bei Zugabe das Konjugat ebenfalls einen stark destabilisierenden Einfluss auf die Peptidstruktur besaß. Das freie D3-Peptid alleine war schon ein sehr potenter Ligand, die Immobilisierung zeigte hier jedoch keine direkte Wirksteigerung des D3_8+-Peptids.

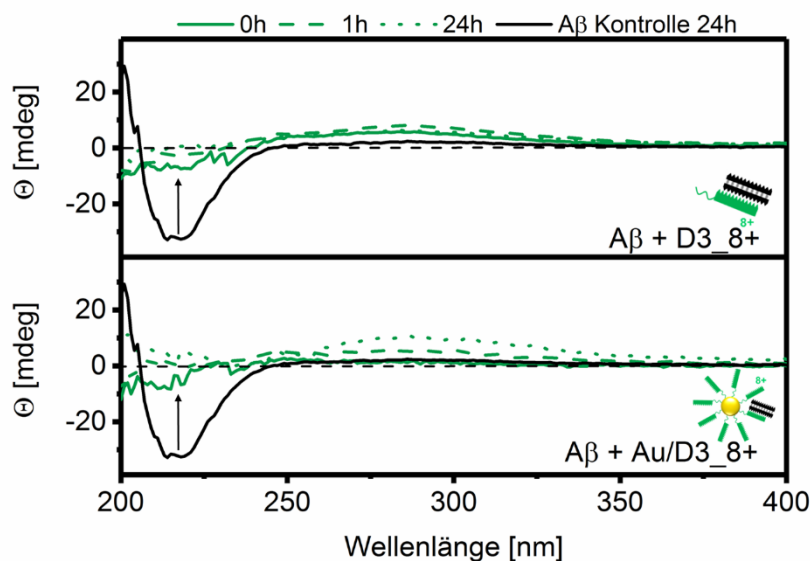


Abb. 83: CD-Spektren über 24 h von A β (schwarz) und mit D3_8+ (oben) und Au/D3_8+ (unten) inkubiert ($c(\text{A}\beta) = 10 \mu\text{M}$; $c(\text{Ligand}) = 10 \mu\text{M}$; $c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$).

Darauffolgend wurde die Wirkung von D3_10+ (**30**), welches die höchste kationische Ladung in seiner Struktur aufwies, in CD-Experimenten untersucht. Der freie Ligand D3_10+ löste die β -Faltblattbande bei 220 nm bei einer Inkubationszeit von einer Stunde langsam auf. Das entsprechende Konjugat beschleunigte diesen Prozess, so dass schon nach Zugabe zur Probenlösung die Intensität der negativen Bande bei 220 nm vollständig reduziert wurde (Abb. 84).

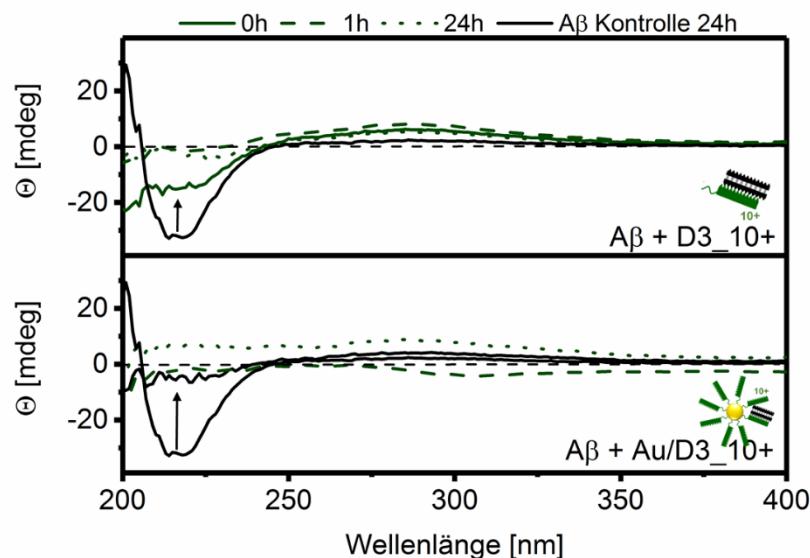


Abb. 84: CD-Spektren über 24 h von A β (schwarz) und mit D3_10+ (oben) und Au/D3_10+ (unten) inkubiert ($c(\text{A}\beta) = 10 \mu\text{M}$; $c(\text{Ligand}) = 10 \mu\text{M}$; $c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$).

Alle D3-Derivate zeigten bei den CD-Untersuchungen einen starken Einfluss auf die Sekundärstruktur von A β . Schon nach kurzer Zeit konnte die typische β -sheet-Bande bei 220 nm aufgelöst werden. Dies deutete auf eine schnelle Destabilisierung der β -Faltblätter hin. Die Konjugate zeigten eine ähnliche Wirkung, teilweise beschleunigten sie sogar die Auflösung dieser Bande und konnten somit eine effektive Reduktion des β -Faltblattgehalts in der Lösung erreichen.

3.1.4.3 Rasterkraftmikroskopie- (AFM) und Transmissionselektronenmikroskopieuntersuchungen (TEM)

Bei der Rasterkraftmikroskopie (engl. *atomic force microscopy*, AFM) wird die Oberfläche einer Probe mechanisch abgetastet. Durch die Führung einer an einer Blattfeder (*Cantilever*) befestigten kleinen Nadel kann eine Fläche gescannt werden. Die Blattfeder wird beim Scannen durch Veränderung der Oberflächenstruktur positionsabhängig unterschiedlich weit gebogen. Diese Biegung kann gemessen werden und ist ein Maß für Kräfte, die zwischen der Spitze und der gescannten Oberfläche wirken. Es können starke abstoßende Kräfte (Coulomb-Abstoßungen) und anziehende (Van-der-Waals- und Kapillarkräfte) auftreten, die Bewegungen werden durch ein laserbasiertes Detektionssystem aufgenommen. Aus diesen Daten kann anschließend ein Bild der Oberflächenstruktur erzeugt werden.^[195]

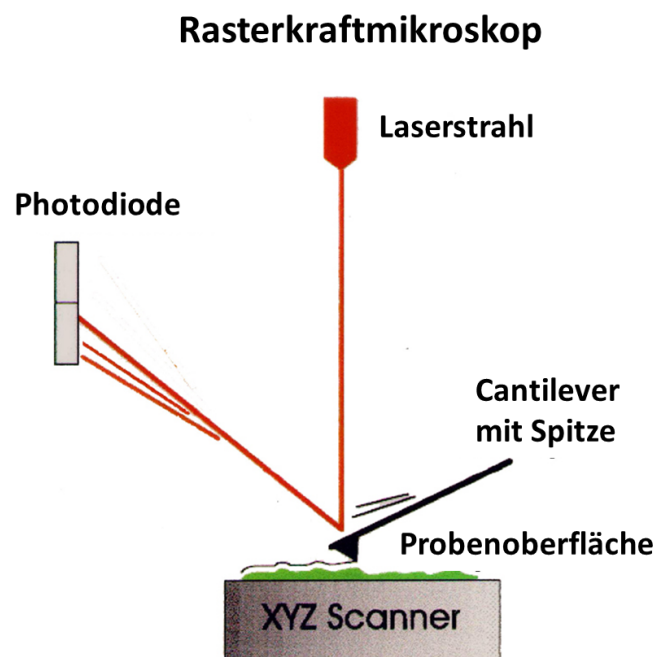


Abb. 85: Schematische Darstellung der AFM-Methode (modifiziert nach ^[196]).

Die Fibrillenlänge, Höhe und Dichte der inkubierten A β -Proben sollte mit Hilfe von Rasterkraftmikroskopiebildern visualisiert und ausgemessen werden. Bei dieser Technik war es möglich, sowohl Fibrillen, Oligomere und auch Nanopartikel zu detektieren.

Zu Beginn wurden 100 μ M zuvor monomerisiertes A β (1-42) nach dem Protokoll von Stine *et al.* über 24 h bei einem pH-Wert von 2 vorinkubiert.^[197] Anschließend wurden die A β -Proben entweder mit Liganden, reinen Nanopartikeln oder Konjugaten versetzt und weiter inkubiert. Als Kontrolle diente eine Probe ohne weitere Zugabe von Testsubstanzen. Die Endkonzentrationen betrugen für AuNP = 125 μ g/mL, D3_5+ = 25 μ M und A β = 50 μ M.

Über einen Inkubationszeitraum von einer Woche konnte so die inhibierende Wirkung der Testsubstanzen auf die Fibrillenbildung im Vergleich zu den Kontrollproben mit A β ohne Ligandenzugabe beobachtet werden. In **Abb. 86** wird deutlich, dass sich über einen Zeitraum von sieben Tagen unter den verwendeten Bedingungen noch weiter lange, fibrilläre Strukturen ausbilden konnten. Die Zugabe von reinen Goldnanopartikeln beeinflusste die Fibrillenstruktur kaum und die Fibrillenmenge nur geringfügig. Bei Zugabe von freien D3_5+-Liganden konnte eine moderate Auflösung der vorhandenen Fibrillen und eine Verhinderung von neuen Fibrillen gezeigt werden. Dieser Prozess beschleunigte sich enorm bei den entsprechenden Konjugaten. Nach sieben Tagen konnten hier nur noch kurze A β -Fragmente in den Proben mikroskopiert werden.

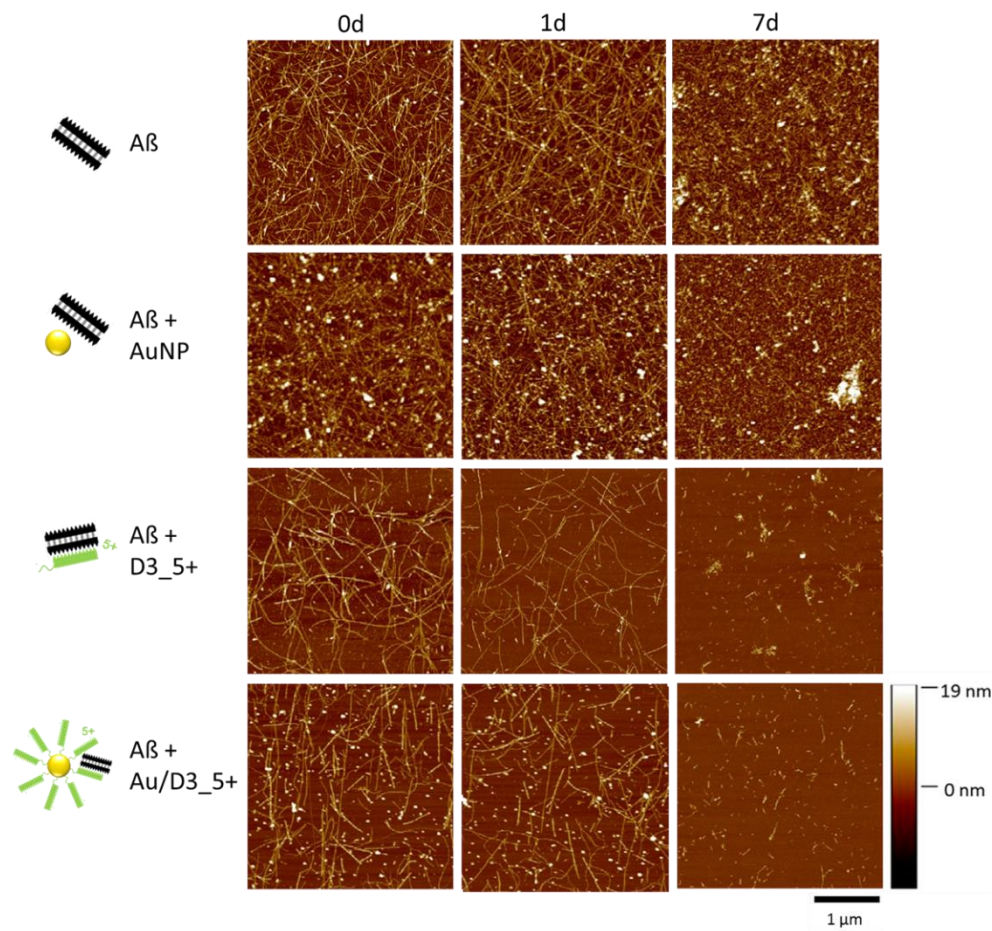


Abb. 86: AFM-Bilder von Aβ-Fibrillen nach 0-7 Tagen Inkubation. Aβ wurde mit reinen AuNPs, D3_5+ und Au/D3_5+ inkubiert. Von den Proben wurden unverdünnte AFM-Aufnahmen angefertigt ($c(\text{AuNP}) = 125 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{Ligand}) = 25 \mu\text{M}$, $c(\text{A}\beta) = 50 \mu\text{M}$).^[179]

Weiterhin wurde die Dichte von Aβ auf der Trägeroberfläche analysiert und die Länge, bzw. Höhe der Fibrillen vermessen (**Abb. 87**). Der Ligand D3_5+ kann in ungebundem Zustand und auf Gold immobilisiert die Fibrillendichte von Aβ nach sieben Tagen signifikant reduzieren. Beide Testsubstanzen konnten zusätzlich die Fibrillenlänge und Fibrillenhöhe von Aβ über die Zeit verringern. Direkt bei Zugabe der Konjugate waren die Aβ-Fibrillen durchschnittlich 700 nm lang und hatten einen Durchmesser von ca. 3.3 nm, nach sieben Tagen verringerte sich die Fibrillenlänge auf 100 nm und der Durchmesser auf 0.8 nm (**Abb. 87b, c**).

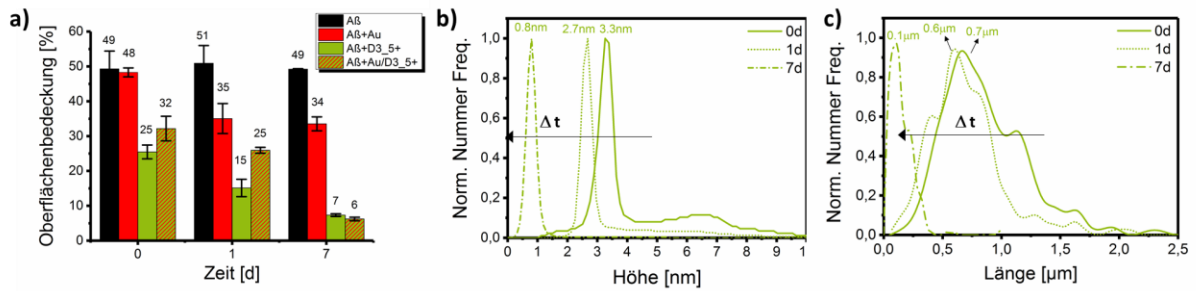


Abb. 87: Auswertung der AFM-Bilder: die prozentuale Oberflächenbedeckung (a), die Reduzierung der Fibrillenhöhe durch Au/D3_5+ (b) und Fibrillenlänge durch Au/D3_5+ (c) nach der Zeit.^[179]

Ebenfalls konnte beobachtet werden, dass sich die Konjugate in direkter Nähe der einzelnen Fibrillen befanden, bzw. in der Nähe von Fibrillenbruchstellen (**Abb. 88**). Die Fibrillen schießen ihre Struktur zu ändern, sobald sie mit den funktionalisierten Nanopartikeln in Kontakt kamen.

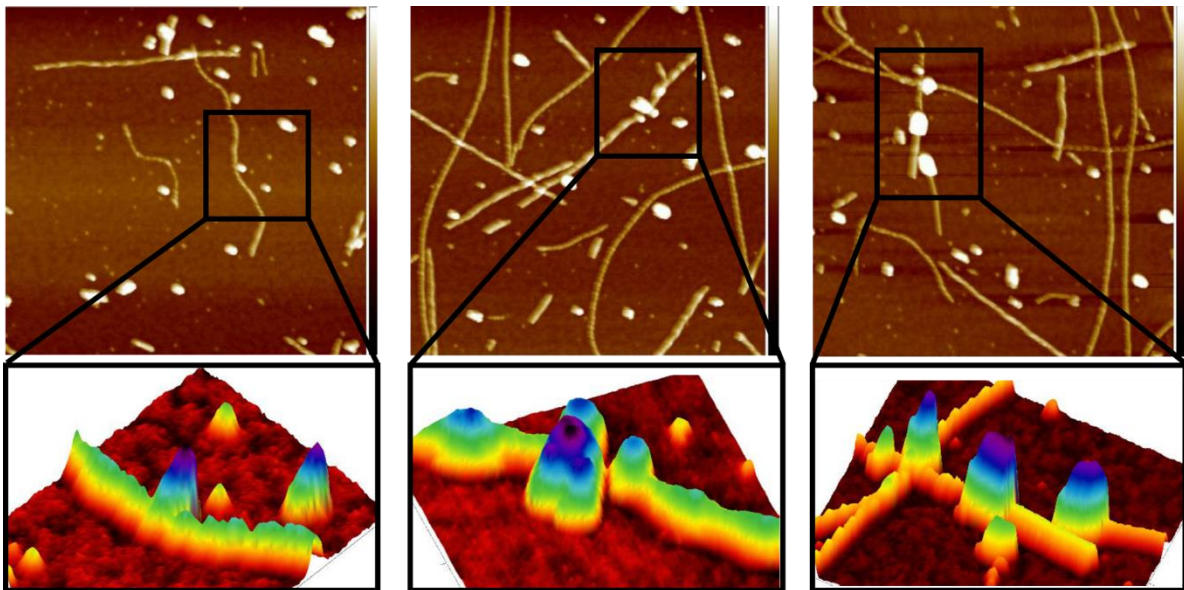


Abb. 88: AFM-Bilder von Aβ-Fibrillen mit Au/D3_5+ nach 24 h Inkubation(oben) Vergrößerung der Fibrillen in 3D (unten).^[178]

Bei genauerer Betrachtung der AFM-Aufnahmen schienen sich in den Proben des ungebundenen D3_5+-Liganden mit Aβ neue größere Strukturen zu bilden (Aβ-D3-Agglomerate). Die Umformung der Fibrillen zu großen amorphen Aggregaten durch D3 wurde bereits von Bartnik *et al.* beschrieben.^[73]

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist eine Untersuchungsmethode, bei der durch einen Elektronenstrahl eine direkte Abbildung von Objekten möglich ist. Hierbei wird ein Objekt mittels Elektronen durchstrahlt, wobei diese mit der Probe teilweise in Wechselwirkung treten und somit einen Kontrast in einer TEM-Aufnahme bilden können. Die Elektronen werden elastisch gebeugt und nur aus ihrer Bewegungsrichtung abgelenkt, sie verlieren jedoch keine Energie. Sie werden von der Kontrastblende in der Beugungsebene der Objektivlinse ausgeblendet. Die Anzahl der abgelenkten Elektronen hängt von der Probendicke ab, somit wirken dickere Probenstellen auf dem erzeugten Bild dunkler.^[198]

Von den verwendeten Probenansätzen für die AFM-Messungen wurden zusätzlich noch TEM-Bilder aufgenommen (**Abb. 89**). Hier konnten bei der Kontrollprobe (A β) erneut lange, dünne fibrilläre Strukturen durch Anfärbung mit Uranylacetat abgebildet werden. Freie Goldnanopartikel befanden sich bei den TEM-Aufnahmen gruppiert und lagerten sich an den A β -Fibrillen an. Dies wies erneut auf die unspezifischen Wechselwirkungen zwischen der Nanopartikeloberfläche und den Fibrillen hin. Bei der Inkubation mit freien D3_5+ Liganden und A β bildeten sich neue andersförmige Agglomerate, die schon in den AFM-Aufnahmen zu erkennen waren. Es waren weiterhin kaum noch fibrillenartige Strukturen zu erkennen. Die hergestellten Konjugate konnten die A β -Fibrillen auflösen, bzw. die weitere Aggregation von A β inhibieren. Hier waren nur noch kurze Fibrillenstücke erkennbar, so dass auch hier die Umwandlung von bestehenden Fibrillen in andere A β -Formen vermutet werden konnte.

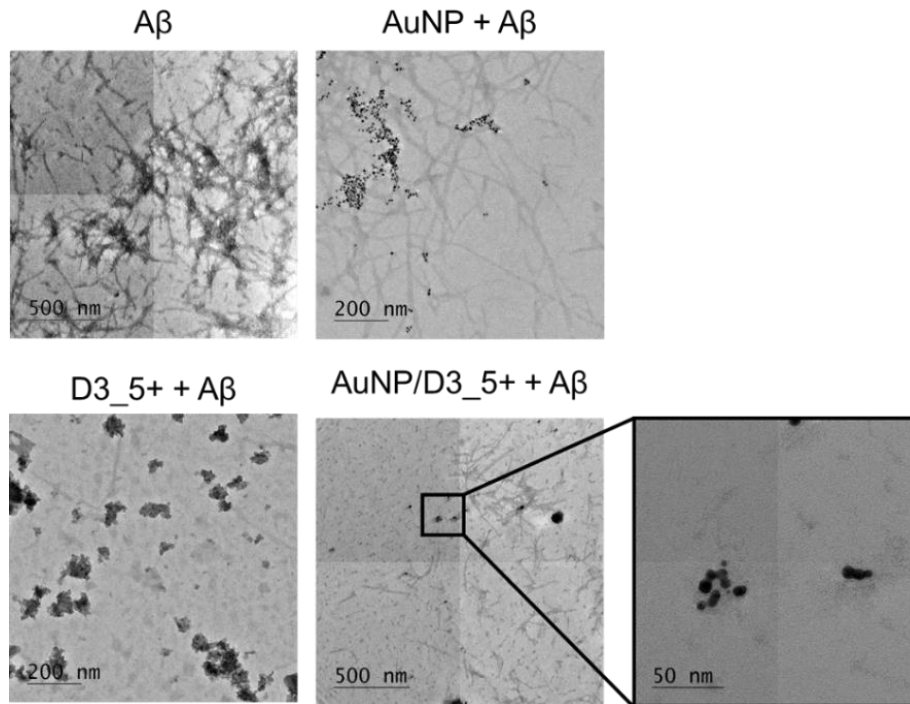


Abb. 89: TEM-Bilder von A β (Kontrolle) und A β mit Goldnanopartikeln, D3_5+ oder Au/D3_5+ inkubiert. Die Proben wurden unter AFM-Bedingungen hergestellt und mit 2 % ethanolischer Uranylacetatlösung angefärbt ($c(\text{A}\beta) = 50 \mu\text{M}$, $c(\text{AuNP}) = 125 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{D3}_5+) = 25 \mu\text{M}$).^[179]

Sowohl bei AFM-, als auch bei TEM-Aufnahmen konnte eine erhöhte Wirksteigerung bei D3-Liganden beobachtet werden, sobald diese auf Goldnanopartikel immobilisiert wurden. Die Bilder zeigten bei den freien D3-Liganden die Bildung neuer größerer amorpher Strukturen, bei den Konjugaten war eine Reduzierung der A β -Fibrillenmenge auf den Trägoberflächen sichtbar.

3.1.4.4 Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) und enzymgekoppelter Immunsorptions-test (ELISA)

Die Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) ist eine physikalische Methode, bei der durch Einsatz einer Ultrazentrifuge eine Auftrennung von Peptiden oder Proteinen nach deren Aggregatgröße erfolgt. Die Auftrennung findet anhand der Sedimentationsgeschwindigkeit oder Dichte der eingesetzten Proben statt. Es wird hierbei ein Dichtegradientenmaterial verwendet, welches von oben nach unten eine ansteigende Dichte aufweist, um die aufgetrennten Partikel an der Diffusion zum Zentrifugengefäßboden zu hindern. So werden zu große Partikelformen nicht zu schnell zum Boden sedimentiert und dort auch nicht pelletiert. In den Experimenten wurde eine Iodixanollösung verwendet. Iodixanol ist wasserlöslich und bindet selbst keine Proteine,

wodurch die A β -Aggregation nicht beeinflusst werden konnte. Nach der Zentrifugation wurden 23 Fraktionen des Gradienten von oben nach unten abgenommen und in Eppendorfgefäße überführt. Die DGZ diente in dieser Arbeit dazu, A β -Aggregate nach Form und Masse aufteilen zu können und A β unter verschiedenen Inkubationszeiten untersuchen zu können. Es konnte somit die vermehrte Bildung einer gewünschten A β -Spezies (Monomere und Oligomere oder große Fibrillen und große Aggregate), mit Hilfe der Inkubationszeiten gesteuert werden. Hierbei befanden sich kleine A β -Spezies, wie Monomere in den ersten Fraktionen, größere Spezies waren in den späteren Fraktionen vorzufinden.

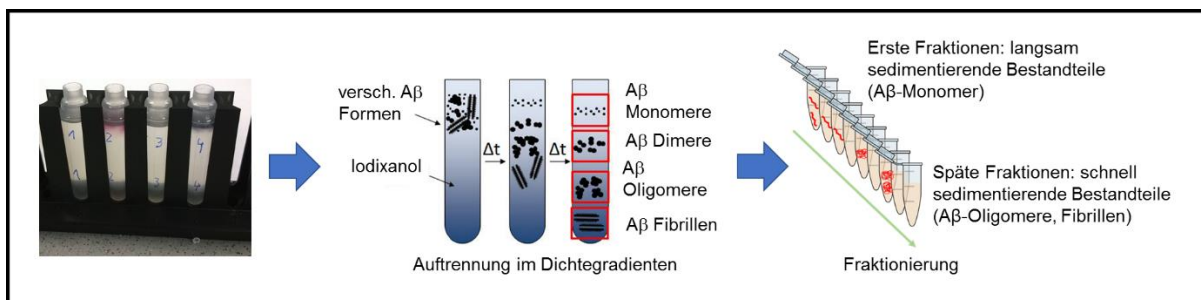


Abb. 90: Schematische Darstellung der DGZ-Methode: A β -Spezies werden nach ihrer Größe und Masse im Gradienten aufgetrennt und anschließend von oben nach unten in Eppendorfgefäße überführt.^[179]

Die in einzelnen Fraktionen nach ihrer Größe aufgeteilten A β -Spezies konnten anschließend mittels eines enzymgekoppelten Immunoabsorptionstests (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA) nachgewiesen werden.

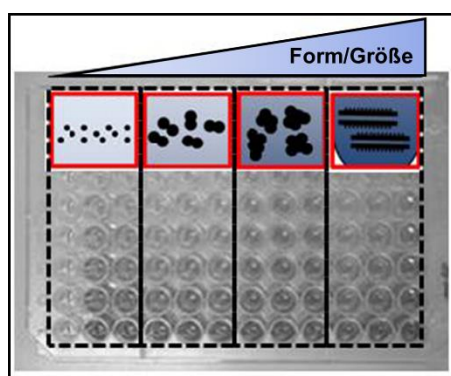


Abb. 91: Auftragung der DGZ-Fractionen auf eine Mikrotiterplatte, um anschließend die A β -Spezies mittels ELISA bestimmen zu können.^[179]

Hierbei handelt es sich um ein immunologisches Nachweisverfahren, welches mit einer enzymatischen Detektionsreaktion gekoppelt ist (z.B. Farbreaktion oder Detektion mittels Fluoreszenz). Bei dem indirekten ELISA wird ein Antigen (hier A β (1-42)) direkt auf eine Polystyroloberfläche adsorbiert und anschließend mit einem spezifischen Primärantikörper inkubiert. Dieser primäre Antikörper bindet mit seinem antigen-spezifischen Fragment an das Epitop des Antigens. Im nächsten Schritt werden die Proben auf der Mikrotiterplatte mit einem sekundären Antikörper inkubiert, der mit einem kovalent gebundenem Enzym gekoppelt ist. Der sekundäre Antikörper bindet mit seinem variablen Teil an das konstante Fragment des Primärantikörpers. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym katalysiert eine chemische Reaktion, bei der das entstehende Produkt detektiert werden kann. Das Prinzip des indirekten ELISA wird in **Abb. 92** dargestellt.

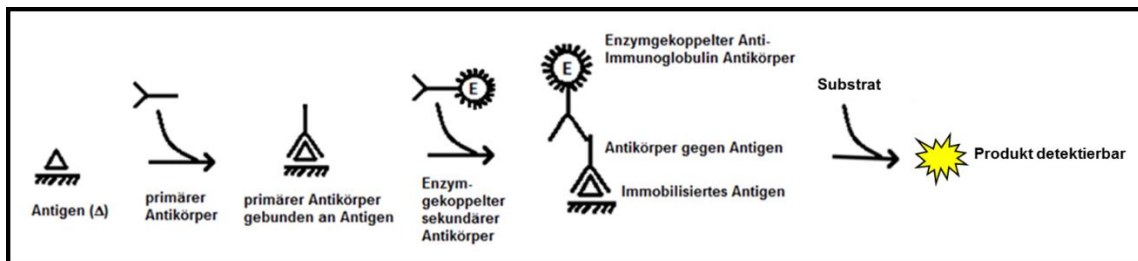


Abb. 92: Prinzip des indirekten ELISA-Verfahrens mit primärem und sekundärem Antikörper (modifiziert nach ^[199]).

Bei den DGZ/ELISA-Experimenten wurden zunächst verschiedene Inkubationszeiten untersucht. Hierbei war es möglich, unterschiedliche Zeitpunkte in der A β -Aggregation zu erfassen. Wurden nur kurze Inkubationszeiten (1.5 h) verwendet, so ließen sich in den Experimenten überwiegend nur monomere, kleine bis mittlere oligomere Formen von A β finden (mittlere Fraktionen). Große Aggregate, Protofibrillen und reife A β -Fibrillen konnten nach einer Inkubationszeit von 24 h vermehrt in den späteren Fraktionen gefunden werden.

Zuerst wurden die Proben für 1.5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Es wurde ein 1:1 Verhältnis von A β zu Ligand getestet. Für die Konjugate wurde ein 418:1 Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis gewählt. Als Proben wurde A β als Referenz, der Ligand D3_5+ und das entsprechende Konjugat Au/D3_5+ untersucht. Ebenfalls wurden die freie Goldnanopartikel als vierte Probe getestet, um eine mögliche unspezifische Wechselwirkung zwischen A β und den Nanopartikeln auszuschließen zu können. In **Abb. 93** wird die Auswertung des Experimentes gezeigt.

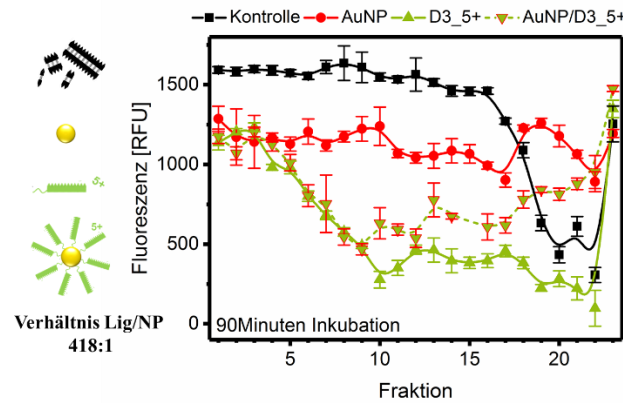


Abb. 93: Quantifizierung der A β -Spezies durch DGZ/ELISA. Nach 90 Minuten Inkubationszeit wurde der Einfluss von reinen AuNPs, D3_5+ und Au/D3_5+ untersucht. Das Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis lag bei 418:1 ($c(\text{AuNP}) = 200 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{D3}_5+) = 40 \mu\text{M}$, $c(\text{A}\beta) = 40 \mu\text{M}$).

Da bei dem verwendeten Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis noch freie Liganden in Lösung vorlagen (nur ca. 30 % der Liganden waren an die Nanopartikeloberfläche gebunden), war kein großer Unterschied zwischen der Wirkung der freien Liganden, bzw. der Wirkung der Konjugaten auf A β erkennbar. Dementsprechend wurde als nächstes ein Verhältnis von 140:1 Liganden pro Nanopartikel getestet (**Abb. 94a**). Hierfür wurde die 3-fache Goldnanopartikelmenge eingesetzt, so dass kaum noch ungebundene Liganden in der Konjugatprobe vorlagen. Auch die höhere Goldnanopartikelkonzentration beeinflusste die A β -Aggregation nicht (rote Linie). **Abb. 94** zeigt die Verteilung der entstandenen A β -Spezies bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. Es wurde jeweils zur Kontrolle reines A β , A β mit Goldnanopartikeln, A β mit freien D3_5+-Liganden und A β mit Au/D3_5+-Konjugat nach 1.5 h, bzw. nach 24 h Inkubationszeit untersucht. In der A β -Kontrolle waren bei einer kurzen Inkubationszeit alle A β -Spezies, von Monomeren/Dimeren bis hin zu Protofibrillen und reifen Fibrillen, in jeder Fraktionen detektierbar (schwarze Linie, **Abb. 94a**). Auch die Inkubation mit reinen Goldnanopartikeln zeigte einen ähnlichen Verlauf, die Partikel hatten keinen bemerkenswert großen Einfluss auf die Fibrillenaggregation (rote Linie). Wurde sowohl der freie Ligand, als auch das Konjugat mit A β über 90 Minuten inkubiert (grüne Linien), so konnte die Bildung von mittelgroßen Oligomeren unterdrückt werden (Fraktionen 4 bis 14). Allerdings wurden größere Oligomere und Aggregate in den Fraktionen 15-23 gebildet. Dies könnte erneut ein Hinweis darauf sein, dass D3_5+ selektiv an A β -Oligomere binden und sich dadurch nichttoxische amorphe Aggregate bilden konnten. Bei den freien Liganden stieg die A β -Konzentration nur in den Fraktionen 17-18 stark an, bei den Konjugaten waren die höheren A β -Spezies auch noch in den Fraktionen 19-23 nachweisbar.

Bei einer Inkubationszeit von einem Tag lagen kaum noch Monomere und kleinere Oligomere in der Kontrollprobe vor, es konnten viele A β -Formen in den späteren Fraktionen (Fraktionen 16-23) detektiert werden (schwarze Linie, **Abb. 94b**). Dies weist auf die Ausbildung von schweren Protofibrillen und großen Aggregatformen von A β hin. Auch bei den Proben mit Goldnanopartikeln konnte dieser Kurvenverlauf beobachtet werden (rote Linie). Eine Verringerung des A β -Anteils in diesen Fraktionen wurde durch die Inkubation mit D3_5+ und Au/D3_5+ erzielt. Die Bildung von A β -Fibrillen wurde mit den Liganden/Konjugaten stark inhibiert (grüne Linien). Es konnte gezeigt werden, dass die D3-Liganden (frei und immobilisiert) auch größere A β -Fibrillen effektiv reduzieren konnten.

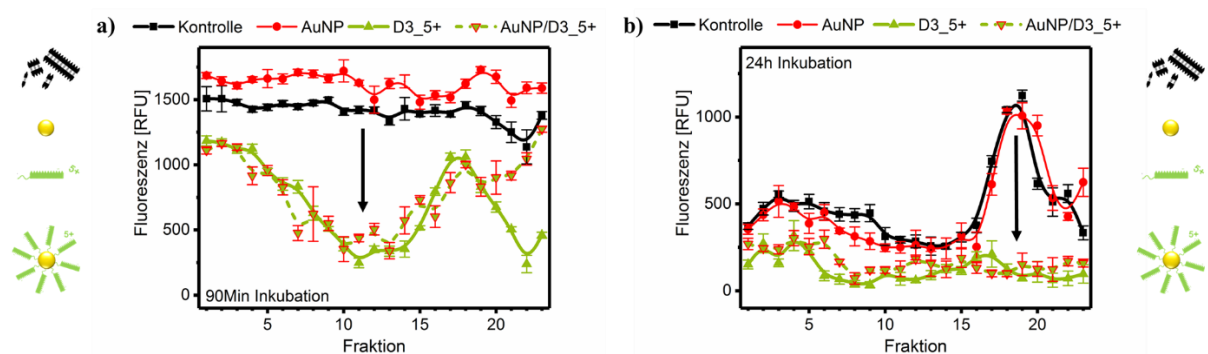


Abb. 94: Quantifizierung der A β -Spezies in den Fraktionen der DGZ mittels ELISA. Es wurde der Einfluss von AuNPs, D3_5+ (40 μ M) und Au/D3_5+ auf A β (1-42) ($c(\text{A}\beta) = 40 \mu\text{M}$) bei unterschiedlichen Inkubationszeiten a) nach 1.5 h ($c(\text{AuNP}) = 600 \mu\text{g/mL}$) und b) nach 24 h getestet ($c(\text{AuNP}) = 200 \mu\text{g/mL}$).^[179]

Die Liganden D3_8+ und D3_10+ zeigten sowohl als freie Liganden, als auch als Konjugate nach 24 h Inkubationszeit sehr ähnliche Ergebnisse bei den DGZ/ELISA-Experimenten wie der D3_5+-Ligand. Es konnte keine erhöhte Fluoreszenz in den Fraktionen 16-23 gemessen werden (**Abb. 95**), so dass auch hier der A β -Anteil in den Fraktionen signifikant reduziert wurde. Die Erhöhung der positiven Ligandenladung hatte demnach bei den DGZ/ELISA-Untersuchungen keinerlei nachweisbare Wirksteigerung der Liganden erzeugt.

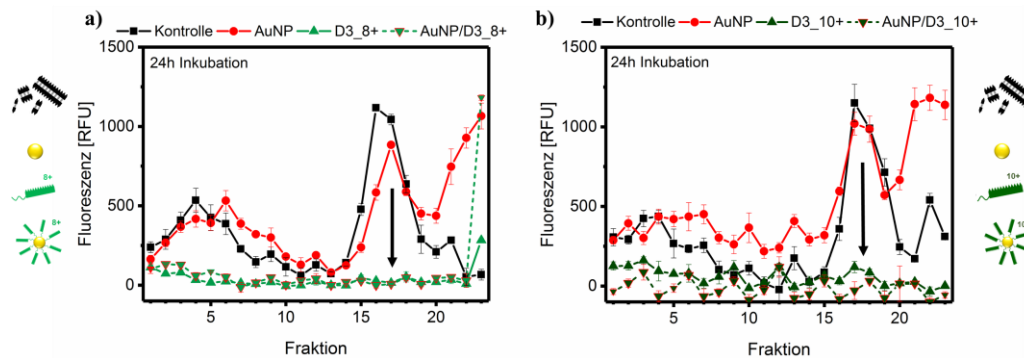


Abb. 95: Ergebnisse des DGZ/ELISA-Experiments von A β mit unterschiedlichen D3-Liganden nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C. Es wurden jeweils die reinen Goldnanopartikel, A β als Referenz und (a) D3_8+ und Au/D3_8+, (b) D3_10+ und Au/D3_10+ untersucht ($c(\text{AuNP}) = 200 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{Ligand}) = 40 \mu\text{M}$, $c(\text{A}\beta) = 40 \mu\text{M}$).

Bei einer Inkubationszeit von 24 h sammelte sich jeweils in der 18. Fraktion der höchste Anteil an A β an. Daher ist diese Fraktion besonders aussagekräftig, um einen Unterschied zwischen der Referenzprobe und den getesteten Substanzen zu beobachten. In **Abb. 96** wird die aggregationsinhibierende Wirkung der Liganden auf die A β -Menge aus den 18. Fraktionen der Experimente in einem Balkendiagramm dargestellt.

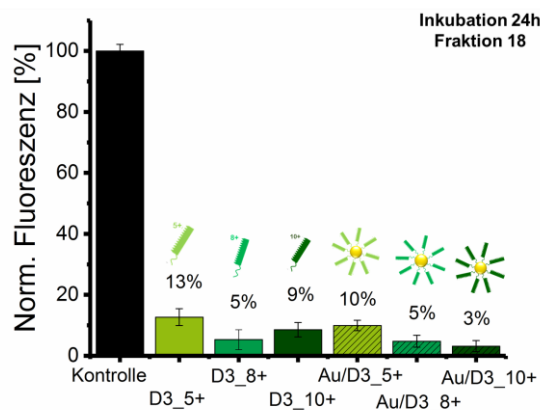


Abb. 96: Auswertung des A β -Gehaltes in der 18. Fraktion. Es wird die Kontrollprobe A β und der Einfluss der untersuchten Substanzen (D3-Derivate und Au/D3-Konjugate) auf die A β -Menge nach einer Inkubationsdauer von 24 h bei 37 °C dargestellt.

Als Referenz (= 100 %) wurde die Probe ohne Ligandenzusatz herangezogen. Die gemessenen Fluoreszenzsignale der Proben mit Ligandenzusatz zeigten, dass alle freien D3-Derivate die Menge an A β in dieser Fraktion auf 5-13 % reduzieren konnten. Eine effektivere Inhibierung der Fibrillenbildung hatten die auf Goldnanopartikel immobilisierten D3-Derivate, hier zeigten sich eine Reduktion des Fluoreszenzsignals auf 3-10 %.

Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein Heptapeptid R₅WC untersucht. Hierbei sollte getestet werden, wie stark sich die Wirkung auf A β bei diesem Peptid (ebenfalls fünf positive Ladungen) von dem D3_5+-Peptid unterschied. Die Ergebnisse sind in **Abb. 97** dargestellt. Es wurde deutlich, dass auch dieses Peptid die A β -Aggregatbildung in den Experimenten effektiv reduzieren konnte. Ebenfalls zeigte sich dadurch, dass D3_5+ nicht sequenzspezifisch wirkte, sondern die Interaktionen mit A β auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den polykationischen Liganden und A β zurückzuführen sind.

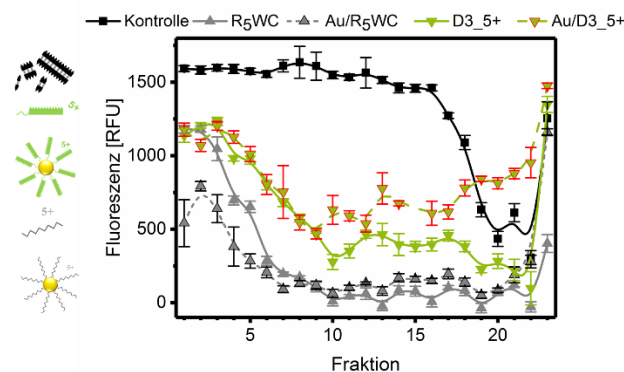


Abb. 97: Einfluss von R₅WC und Au/ R₅WC (grau) auf die A β -Aggregation in der DGZ/ELISA untersucht. Zum Vergleich die Liganden D3_5+ und Au/D3_5+ (grün). Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten bei 37 °C (c(AuNP) = 200 µg/mL, c(Ligand) = 40 µM), c(A β) = 40 µM).

Weiterhin wurde untersucht, ob der Zusatz eines Stabilisators die Wirkung der Konjugate verbessern würde. Hierfür wurden die Proben jeweils mit BSA versetzt (bei den Konjugaten nach der Immobilisierung), erst dann zur A β -Probe gegeben und über 24 h inkubiert. BSA (engl. *bovine serum albumin*) ist ein Protein, welches zu 76 % der Sequenz von menschlichem Serumalbumin ähnelt und somit häufig als Testsubstanz genutzt wird. Goldnanopartikel werden mit BSA versetzt, um diese elektrostatisch und sterisch zu stabilisieren.^[200,201]

In **Abb. 98** werden die jeweiligen Ergebnisse gezeigt. Links konnten die eingesetzten Liganden direkt mit dem A β -Peptid wechselwirken, in der rechten Abbildung wurde noch zusätzlich BSA hinzugegeben. Es wurde deutlich, dass die Zugabe von BSA die Interaktion zwischen dem A β -Peptid und den Liganden störte, da kaum noch eine Reduzierung der A β -Spezies beobachtet werden konnte. Alle Proben wiesen hier einen ähnlichen Verlauf wie die A β -Kontrollprobe auf. Es wäre zum einen denkbar, dass sich eine Schicht aus BSA (Proteincorona) über den Liganden, bzw. Goldnanopartikeln und Konjugaten bildete, so dass die D3-Liganden nicht mehr direkt mit A β wechselwirken konnten. Zum anderen könnte BSA allerdings auch direkt mit dem A β -Peptid interagiert und somit die Fibrillenbildung verhindert haben.

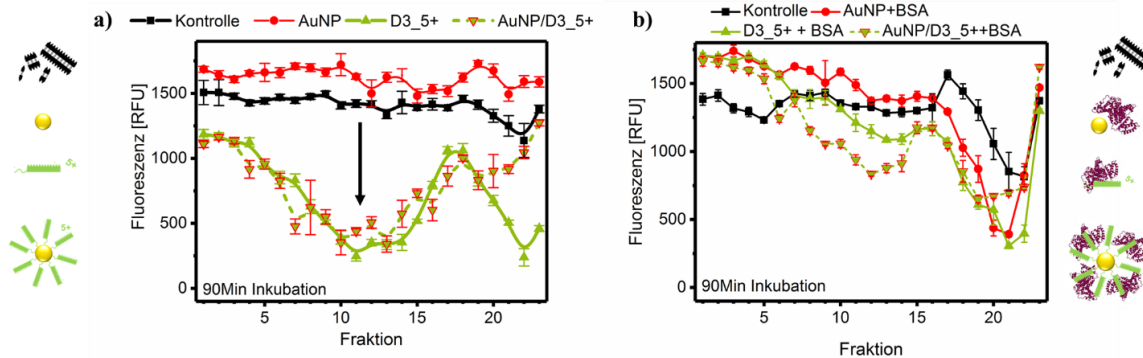


Abb. 98: Quantifizierung der A β -Spezies ($c(\text{A}\beta) = 40 \mu\text{M}$) in den Fraktionen der DGZ mittels ELISA nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten bei 37 °C. (a) reine AuNP, D3_5+ und Au/D3_5+ ($c(\text{AuNP}) = 600 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{Ligand}) = 40 \mu\text{M}$), (b) Zusatz von BSA vor der Inkubation zu den reinen AuNP, D3_5+ und Au/D3_5+ ($c(\text{AuNP}) = 200 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{Ligand}) = 40 \mu\text{M}$, $c(\text{BSA}) = 40 \mu\text{M}$).

Allgemein musste bei den DGZ/ELISA-Experimenten beachtet werden, dass die Goldnanopartikel aufgrund ihrer hohen Dichte (19.3 g/cm^3) bei einer Zentrifugationsdauer von 4.5 h bis auf den Boden der Zentrifugengefäße sedimentierten. Demnach könnten die Konjugate und auch die unfunktionalisierten Nanopartikel zusammen mit A β , welches spezifisch, bzw. unspezifisch mit den Proben wechselwirkte, bis auf den Zentrifugengefäßboden gewandert sein.^[178]

3.1.4.5 Zellkulturassay und Mikroskopie der Zellen

In Zellkulturexperimenten sollte untersucht werden, inwieweit die hergestellten Verbindungen *in vivo* exprimiertes A β spezifisch unterdrücken können. Die Zellkulturexperimente wurden nach einem Protokoll von Podlisny *et al.* durchgeführt.^[202] Hierzu wurde eine CHO-Zelllinie (engl. *chinese hamster ovary*) verwendet, die ein mutiertes APP (V717F) überexprimiert und A β sekretiert. Es handelt sich hierbei um 4 kDa A β -Monomere und ~ 8.5 bis 12.5 kDa große A β -Spezies. Die größeren A β -Spezies bestanden aus N-terminal verlängerten A β -Monomeren und niedrigen synaptotoxischen A β -Oligomere.^[203]

Die Zellen wurden jeweils mit reinen Goldnanopartikeln, freien D3-Liganden und deren Konjugaten inkubiert, um den Einfluss der Proben auf die 10-15 kDa großen A β -Spezies zu testen. Als Kontrolle diente der γ -Sekretaseinhibitor LY411575, der die A β -Entstehung vollständig unterdrückte. Aus dem Zellüberstand wurde das A β mit einem A β -spezifischen Antikörper (4G8) immunopräzipitiert und mittels Western-Blot untersucht. In **Abb. 99** sind die Ergebnisse der Experimente dargestellt.

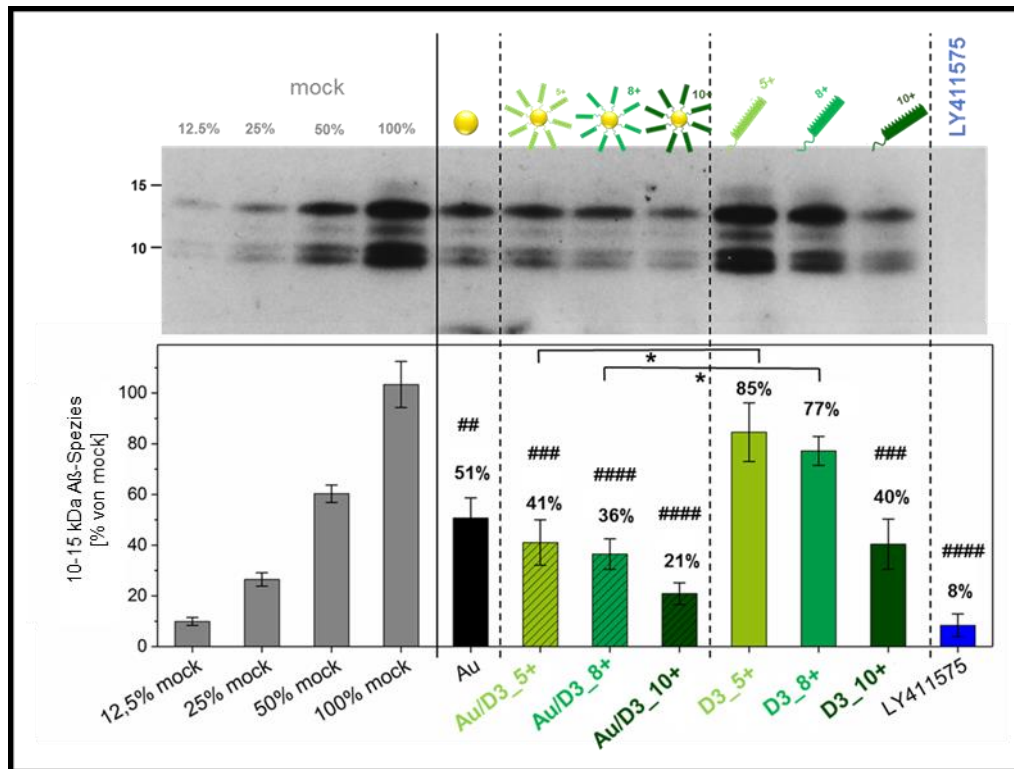


Abb. 99: Wirkung der Substanzen im Zellaassay auf 10-15 kDa große Aβ-Spezies ($c(\text{AuNP}) = 50\mu\text{g/mL}$, $c(\text{Ligand}) = 10\mu\text{M}$, Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis 418:1). Als Kontrolle wurde der γ -Sekretase-inhibitor LY411575 (20 nM) verwendet. Dargestellt sind die mittleren Signalintensitäten relativ zur Kontrolle (mock) (ANOVA, Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes, $p < 0,0001$, $n = 4$, $F(8, 27) = 15, 34$). Signifikante Unterschiede angegeben aus dem *Tukey* post-hoc Test zwischen freien und gebundenen Liganden (* $p < 0,05$) und Proben und mock (## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$). (one way ANOVA, Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes, $p < 0,0001$, $n = 4$, $F(8, 27) = 15, 34$).^[179]

Bei der Auswertung der Experimente konnte erneut eine Wechselwirkung zwischen der freien Goldnanopartikeloberfläche und Aβ beobachtet werden (Reduzierung von Aβ auf 51 %) (**Abb. 99**). Alle getesteten Substanzen verringerten die Menge an Aβ im Zellmedium. Die Wirkung der D3-Derivate stieg mit ihrer Ladung an, D3_5+ reduzierte die Aβ-Produktion auf 85 %, eine Verdoppelung der Ladung (D3_10+) verringerte die Produktion auf 40 %. Dieser Trend konnte auch bei den Konjugaten beobachtet werden (Au/D3_5+: 41 %, Au/D3_10+: 21 %). Wurden die Liganden auf Nanopartikel immobilisiert, konnte demnach eine größere Reduzierung der Aβ-Menge durch die Konjugate erreicht werden.

Um den Wachstumsverlauf zu überprüfen, wurden die Zellen nach drei Tagen Inkubationszeit mikroskopisch untersucht.

In **Abb. 100** wird gezeigt, dass sich die Zellen alle gleichmäßig auf den Probenträgern verteilten und gleichmäßig gewachsen waren. Die aggregierten Nanopartikel konnten durch Endozytose in die Zellen gelangen und bildeten perinukleare vesikelähnliche Strukturen aus.

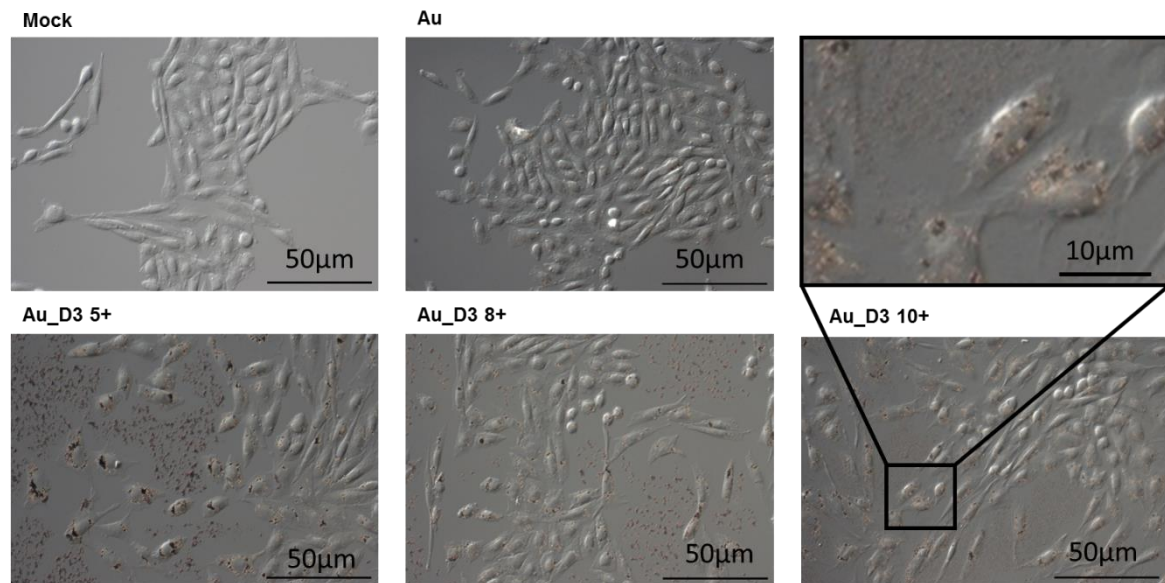


Abb. 100: Lichtmikroskopieaufnahmen der CHO-Zellen, inkubiert mit verschiedenen Substanzen (AuNP, Au/D3_5+, Au/D3_8+ und Au/D3_10+).^[179]

Die untersuchten Proben beeinträchtigten die Viabilität der CHO-Zellen nicht. Ebenfalls war auch nach Behandlung mit den Testsubstanzen keine Verringerung der Proteinkonzentrationen im Zelllysat zu beobachten (**Abb. 101**). Im Caspase-3 Assay konnte zudem bewiesen werden, dass keine Apoptose der Zellen erfolgte (**Abb. 102 links**). Die APP-Expression wurde durch die verwendeten Substanzen nicht beeinflusst (**Abb. 102 rechts**).

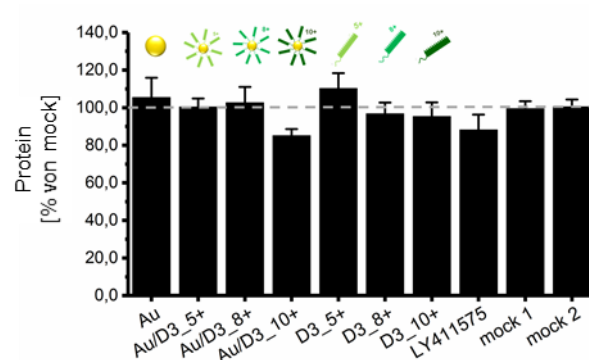


Abb. 101: Auswertung der Proteinkonzentration in den Zelllysaten nach Inkubation mit AuNPs, D3-Derivaten und Au/D3-Derivaten.

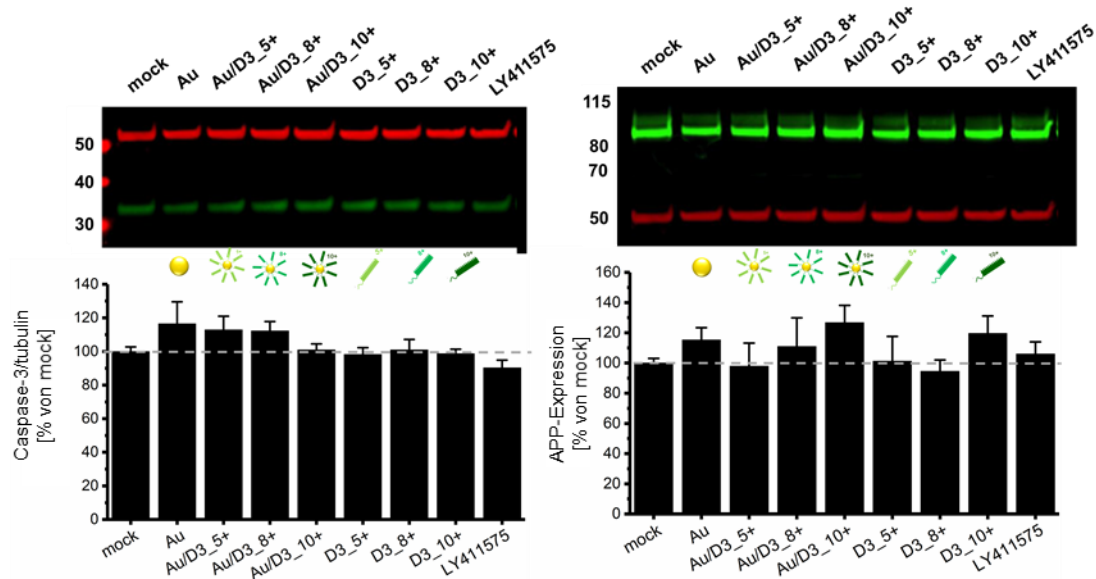


Abb. 102: Ergebnisse des Caspase-3-Assays (Caspase-3 grün, Tubulin rot) und der APP-Expression der CHO-Zellen nach Inkubation mit den AuNPs, D3-Derivaten und Au/D3-Derivaten (APP grün, Tubulin rot).^[179]

Zusätzlich wurden die Proben mit einem Konfokalmikroskop untersucht. Hierbei wird ein spezielles Lichtmikroskop verwendet, bei dem das Präparat nicht im Gesamten beleuchtet wird, sondern nur Stück für Stück von einem Lichtpunkt abgetastet wird. Das reflektierte Licht oder die Fluoreszenz wird nur an einem Punkt angeregt, wodurch Streulicht minimiert und Bilder mit hohem Kontrast entstehen können.^[204] So ist es möglich, dreidimensionale Bilder der Proben zu erzeugen.

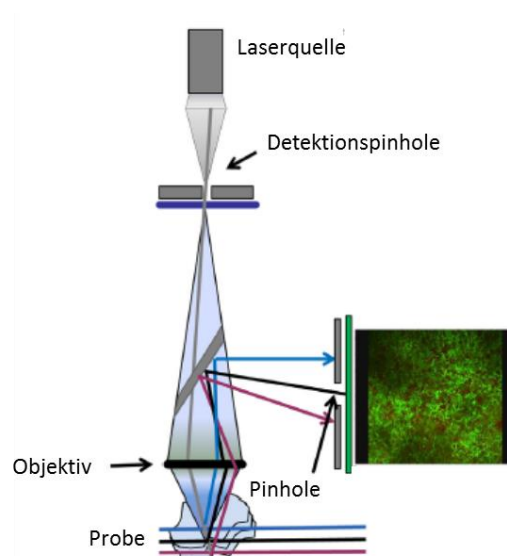


Abb. 103: Prinzip und Aufbau der Konfokalmikroskopie (modifiziert nach ^[205]).

Mit dieser Technik konnten die einzelnen Zellbestandteile farblich visualisiert und so genauere Erkenntnisse über die räumliche Lage der Nanopartikel in den Zellen gewonnen werden (**Abb. 104**). In der gezeigten Abbildung wird noch einmal deutlich, dass sich die Nanopartikel in der gleichen Ebene wie die Zellkerne befanden, so dass auf eine zelluläre Aufnahme geschlossen werden konnte.

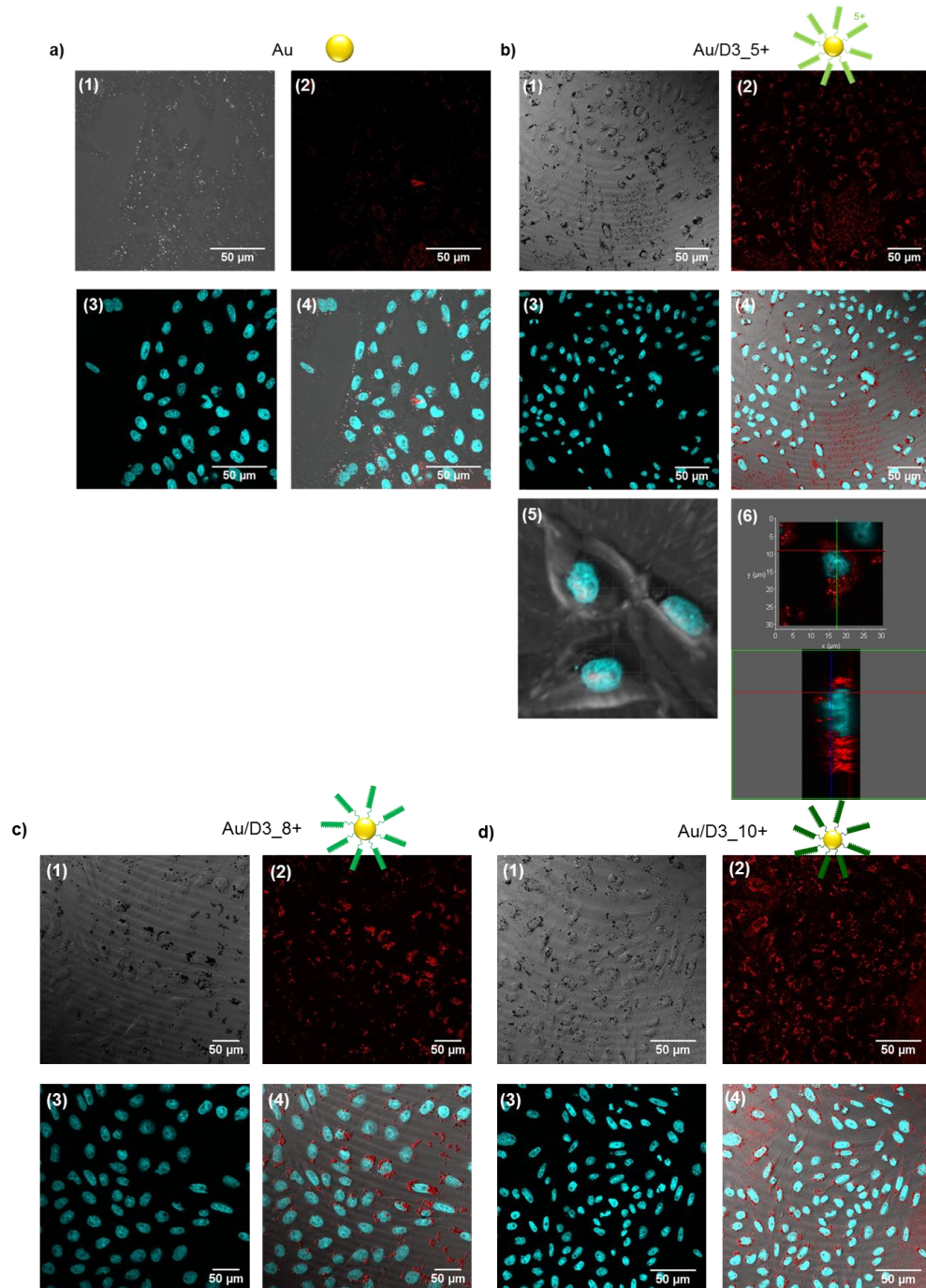


Abb. 104: Konfokalmikroskopieaufnahmen der CHO-Zellen mit AuNP (a), Au/D3_5+ (b), Au/D3_8+ (c) und Au/D3_10+ (d) inkubiert. Darstellung der Zellmembran (grau (1), Verwendung des DIC-Filters), der NP (rot (2), Anregung bei 532 nm), der Zellkerne (blau (3), Anregung bei 405 nm) und Überlagerung aller Filter (4). Vergrößerte Aufnahmen der Zellen (5, 6).^[179]

Neben den bisherigen Zellkulturuntersuchungen wurden noch unterschiedliche D3_5+-Konzentrationen getestet, um die Wirkung von wenig Liganden auf Nanopartikeln (4 Liganden pro Nanopartikel) zu dem in dieser Arbeit standardmäßig höheren Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis (418:1) zu vergleichen. Zuvor wurde eine Konzentration von 10 μM Ligand eingesetzt, nun wurde die Ligandenmenge auf eine Konzentration von 3 μM (125:1), bzw. 0.1 μM (4:1) D3_5+ reduziert. In **Abb. 105** sind die Ergebnisse zusammengefasst.

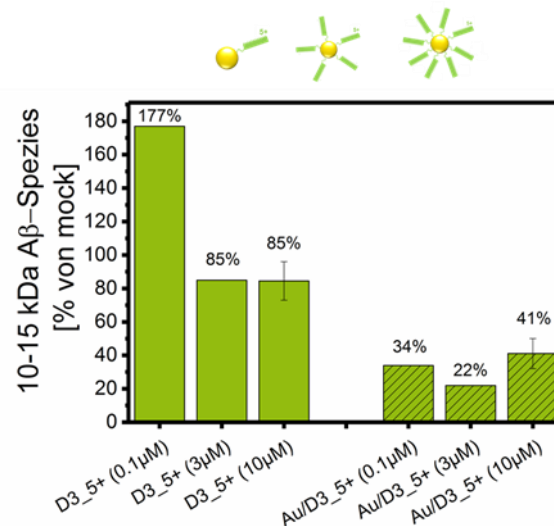


Abb. 105: Wirkung der D3_5+-Verbindung frei und auf Nanopartikel gebunden in unterschiedlichen Konzentrationen auf Aβ in Zellkulturexperimenten ($c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{Ligand}) = 0.1\text{-}10 \mu\text{M}$).

Die jeweiligen Konjugate waren auch bei geringeren Konzentrationen effektiver als die freien Liganden. Die größte Verbesserung wurde durch Verwendung von sehr wenig Liganden erzielt. Hier konnte eine Wirksteigerung durch Immobilisierung der Liganden auf Nanopartikel um den Faktor 5.2 beobachtet werden. Bei einer mittleren Ligandenkonzentration wurde eine Steigerung um den Faktor 3.9 erreicht. Mit einem Verhältnis von 418 zu 1 Liganden pro Nanopartikel hingegen wurde hingegen nur eine Verbesserung um den Faktor 2.1 gezeigt. Es muss auch hier wieder berücksichtigt werden, dass bei höheren Konzentrationen in den Konjugatproben noch freie Liganden in Lösung vorlagen und diese somit zusätzlich einen Einfluss auf die Ergebnisse nehmen konnten.

3.1.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass stabile Konjugate aus D3-Derivaten (D3_5+, D3_8+ und D3_10+) auf Goldnanopartikeln hergestellt werden konnten. Kationische Konjugate (418:1 Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis), bei denen ca. 126 Liganden auf die Nanopartikeloberfläche banden und sich somit ca. 30 % der eingesetzten Liganden noch frei im Überstand befanden, konnten in Funktionalitätstests eingesetzt werden.

Weiterhin wurde der Einfluss von den D3-Derivaten und auf Goldnanopartikeln immobilisierten D3-Derivaten auf A β untersucht: Sobald die Konjugate mit A β inkubiert wurden, konnte mittels TEM-Aufnahmen beobachtet werden, dass sich die Partikelabstände untereinander vergrößerten. Der hydrodynamische Durchmesser erhöhte sich ebenfalls. Dies zeigte, dass sich A β an der Oberfläche der konjugierten Nanopartikel anlagern konnte und somit Interaktionen zwischen den Liganden und dem A β -Peptid stattfanden.

Die Dissoziationskonstante K_D lag bei freien D3-Derivaten im niedrigen mikromolaren Bereich. Bei D3-Konjugaten war der Wert, bezogen auf die Liganden, im Vergleich zu den freien Liganden um bis zu 7-fach niedriger. Es konnte ein starker kooperativer Effekt zwischen den Liganden und den Goldnanopartikeln beobachtet werden. Eine Immobilisierung von D3-Liganden auf Nanopartikel erhöhte demnach die Affinität der Ligandeneinheit zu dem Alzheimerpeptid.

Auch in biophysikalischen Untersuchungen setzte sich dieser Trend fort. Die reinen D3-Liganden hatten in ThT-Experimenten einen inhibierenden Einfluss auf die A β -Fibrillenbildung. Dieser steigerte sich bei Erhöhung der positiven Ligandenladung (D3_5+ < D3_8+ < D3_10+). Durch die Immobilisierung der Liganden auf Goldnanopartikel konnte die Fibrillenbildung im Vergleich zu den freien Liganden um den Faktor 50 verringert werden. Hier zeigten die reinen Goldnanopartikel eine unspezifische Wechselwirkung mit den A β -Fibrillen. Die potenzielle Interferenz der Oberflächenplasmonenabsorption von Gold wurde ausgeschlossen, indem Platinanopartikel mit den entsprechenden D3-Liganden untersucht wurden. Sowohl die Platin-, als auch Goldkonjugate zeigten in den Experimenten sehr ähnliche Effekte auf die A β -Aggregation.

In CD-Experimenten konnten die freien D3-Derivate die β -Faltblattkonformation von A β -Fibrillen moderat auflösen. Die Konjugate destabilisierten die Konformation allerdings noch effektiver. Dies konnte bei allen D3-Derivaten beobachtet werden.

Bei der Visualisierung der A β -Fibrillenstrukturen in AFM-Bildern konnten die reinen Goldnanopartikel die Fibrillenstruktur nicht wesentlich beeinflussen. Es konnte allerdings eine Auflösung der vorhandenen A β -Fibrillen und eine Verhinderung der Entstehung von neuen Fibrillen bei einer Inkubation mit den D3-Derivaten gezeigt werden. Die entsprechenden Konjugate konnten diesen Prozess noch beschleunigt. Die Länge und Höhe der Fibrillen konnten ebenfalls durch die Inkubation mit den D3-Derivaten, bzw. durch die Inkubation mit den Konjugaten verringert werden. Es wurde eine Änderung in der Fibrillenmorphologie beobachtet, sobald sich A β -Fibrillen den funktionalisierten Au/D3_5+-Konjugaten näherten. Es bildeten sich durch diesen Kontakt Bruchstellen innerhalb der Fibrillen.

In der Kombination DGZ/ELISA konnte die Bildung von neurotoxischen Oligomeren schon nach kurzer Inkubationszeit unterdrückt werden. Die Selektivität der D3-Derivate wurde hier deutlich und konnte auch auf Goldnanopartikeln erhalten bleiben. Nach Steigerung der Inkubationszeit besaßen die Substanzen ebenfalls eine Wirkung auf große A β -Fibrillen und wandelten diese in amorphe größere Aggregate um. Die reinen Goldnanopartikel zeigten keinen Einfluss auf die A β -Fibrillenbildung. Auch eine Erhöhung der positiven Ligandenladung von 5+ auf 8+ zeigte hier keinerlei Wirksteigerung. Der Versuch der Stabilisierung von Konjugaten mittels BSA zeigte nicht den erwünschten Effekt, es konnte keine Reduzierung der A β -Spezies durch die Substanzen beobachtet werden. Im Gegenteil, BSA schien eine Interaktion der Liganden und Konjugate mit A β zu verhindern.

In Zelltests wurde ebenfalls eine unspezifische Wechselwirkung von Goldnanopartikeln mit A β beobachtet. Die getesteten Substanzen verringerten hier die Menge an *in vivo* exprimiertem A β im Zellmedium. Eine Wirksteigerung durch die Liganden wurde mit Erhöhung der Ligandenladung (D3_5+ < D3_8+ < D3_10+) erzielt. Die Immobilisierung dieser Liganden auf Goldnanopartikel unterdrückte die Bildung von 10-15 kDa großen A β -Spezies signifikant. Geringere Konzentrationen der Liganden (0.1 μ M) zeigten sogar eine Wirksteigerung durch die Immobilisierung der Liganden um den Faktor 5.2. Keine der verwendeten Substanzen hatte eine negative Wirkung auf die CHO-Zellen, die Zellviabilität blieb erhalten. Mikroskopisch konnte festgestellt werden, dass sich die Nanopartikel auf einer Ebene mit den Zellkernen befanden, eine Aufnahme der Partikel in die Zelle führte demnach trotzdem nicht zur Apoptose der Zellen.

Der Wirkmechanismus von D3-Liganden auf A β wurde durch die Immobilisierung der Liganden auf Goldnanopartikel scheinbar nicht verändert. A β wurde durch die D3-Derivate in amorphe, nicht-toxische Aggregate umgewandelt. Allerdings scheint es, dass die Wechselwirkung der Liganden mit A β hauptsächlich auf elektrostatische Interaktionen der Argininreste in der D3-Sequenz zurückzuführen sind, da das Heptapeptid (R)₅WC durch seine fünf Argininreste ebenfalls eine ähnlich starke inhibierende Wirkung auf die A β -Aggregation wie D3_5+ zeigte.

3.2 β -Faltblattbrecher

3.2.1 Synthese der Aminopyrazolderivate

Als zweite biofunktionale Einheit wurden zunächst neue Aminopyrazolderivate synthetisiert. Das Grundgerüst der Aminopyrazoltrimere wurde nach der Synthesevorschrift von *Hochdörfer* hergestellt.^[83] In **Abb. 106** ist der Syntheseweg zur benötigten Säure des Aminopyrazoltrimers (**44**) dargestellt.

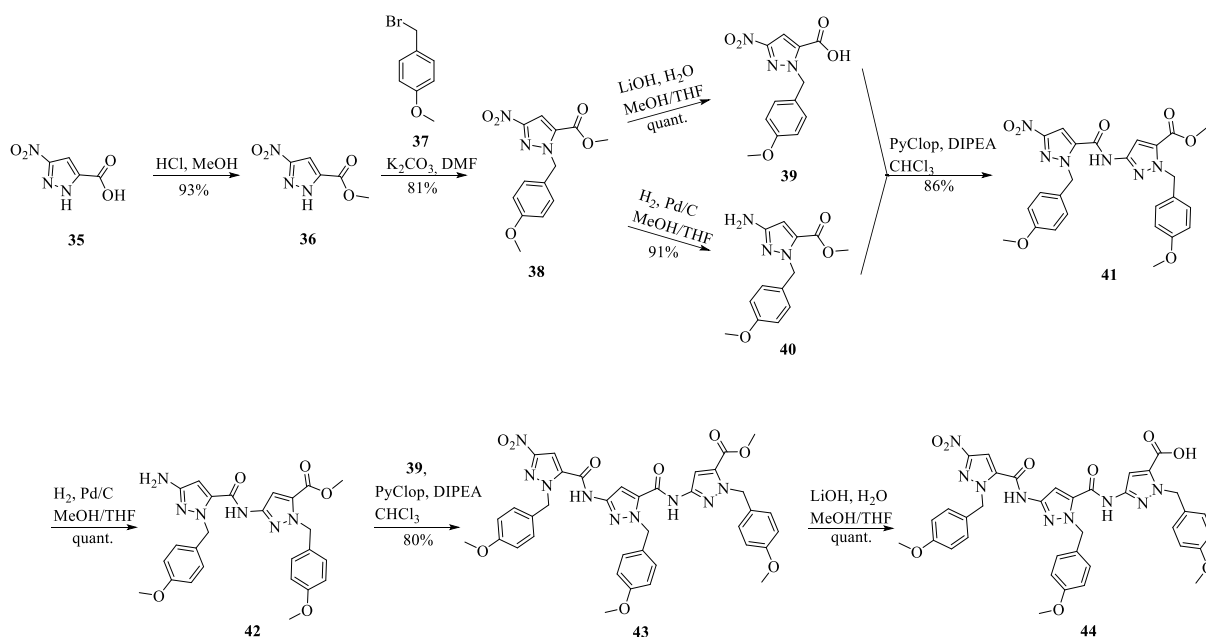
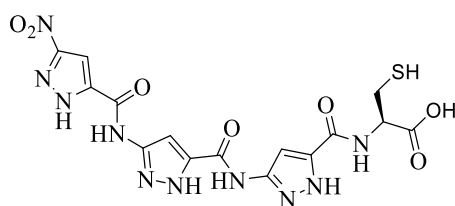


Abb. 106: Syntheschema zum PMB-geschützten Aminopyrazoltrimer (**43**) und der entsprechenden Säure (**44**).

An die Trimersäure (**44**) wurden in einem nächsten Schritt unterschiedliche Aminosäuren geknüpft, um verschieden geladene Liganden herzustellen.

Zunächst wurde versucht die Aminosäure Cystein C-terminal mit der Trimersäure zu kuppeln, um diesen neutralen Liganden (**45**) später auf Goldnanopartikel immobilisieren zu können. Die Kupplung des Trimerderivates erfolgte mittels SPPS an ein mit Cystein vorbeladenes Harz. Anschließend wurde die Verbindung mit Trifluoressigsäure (TFA) entschützt und gleichzeitig von der festen Phase abgespalten.

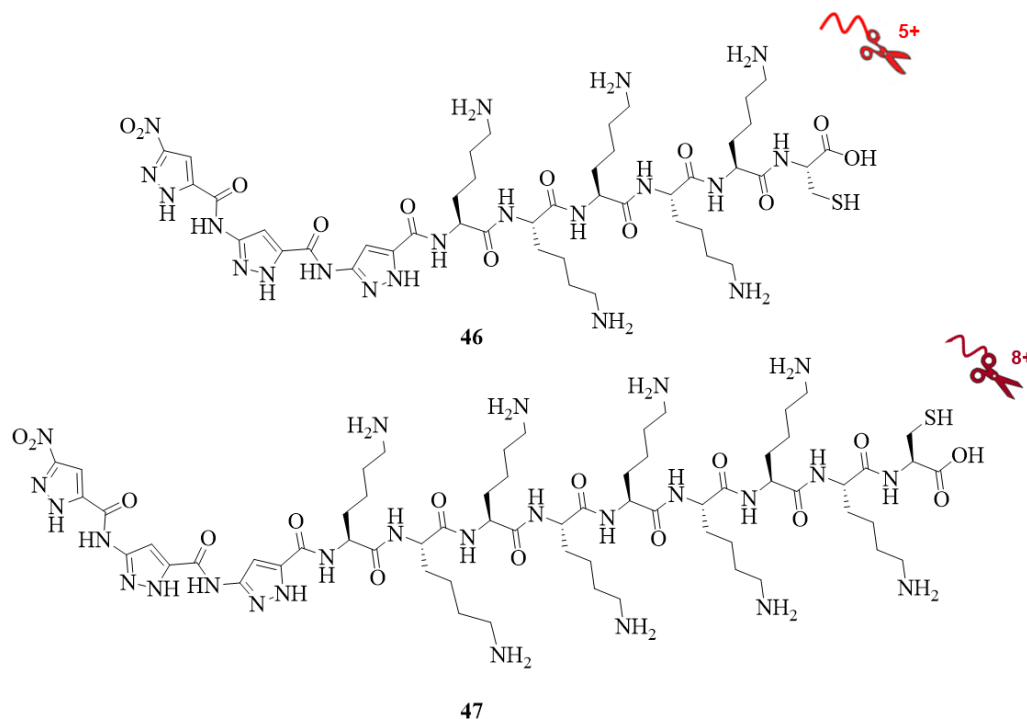


45

Abb. 107: Struktur der wasserunlöslichen Verbindung Trim-Cys (45).

Die Verbindung (45) war allerdings nicht wasserlöslich, so dass im darauffolgenden Schritt eine Immobilisierung auf Nanopartikeln erschwert werden würde.

Um Ladungsanaloge zu den schon untersuchten D3-Derivaten zu erhalten, wurde der Fokus auf Aminopyrazolliganden mit mehrfach positiver Ladung gelegt. So könnten gegebenenfalls in späteren Tests bei bifunktionalen Konjugaten zwei verschiedene Liganden mit ähnlicher Ladung auf die Oberfläche der Nanopartikel immobilisiert werden. Hierfür wurden Aminosäureketten mit (Lys)₅-Cys (51) und (Lys)₈-Cys (52) gewählt, die wie zuvor mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt wurden. Als letzter Schritt wurde Verbindung 44 manuell an die beiden Peptide geknüpft. Nach Abspaltung vom Harz und Entschützung konnten die neuen Verbindungen 46 (Trim_5+) und 47 (Trim_8+) in hoher Reinheit erhalten werden.

**Abb. 108: Strukturen der Verbindungen Trim_5+ (46) und Trim_8+ (47).**

Nach erfolgreicher Synthese wurden die Verbindungen spektroskopisch untersucht. In **Abb. 109** wird das ESI-MS-Spektrum der Verbindung **47** abgebildet. Es konnten alle in dem ESI-MS-Spektrum detektierten Hauptsignale den entstandenen Molekülfragmenten zu geordnet werden. Das Produkt **47** konnte mit einer Reinheit von > 97 % erhalten werden.

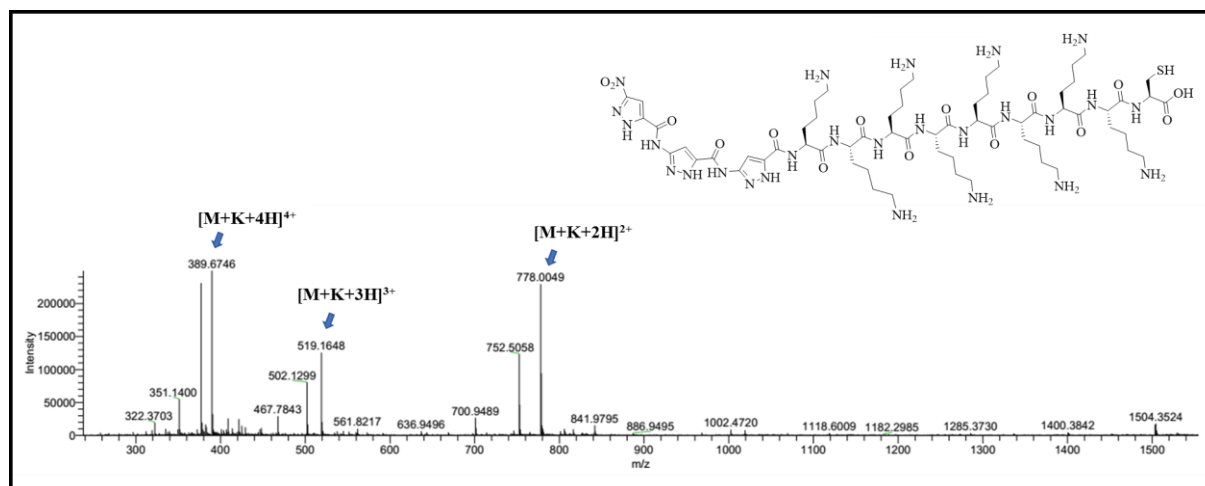


Abb. 109: ESI-MS-Spektrum der Verbindung Trim_8+ (**47**).

Es wurden zwei Trimerverbindungen hergestellt, die in ihrer Ladung den D3-Derivaten **28** und **29** glichen. Trim_5+ besaß, wie D3_5+, insgesamt fünf positive Ladungen, Trim_8+ hatte durch die verwendete Octalysinkette insgesamt die gleiche Anzahl an positiven Ladungen wie D3_8+.

3.2.2 Goldnanopartikel mit Aminopyrazolderivaten

Die neuen Verbindungen **46** und **47** wurden auf Goldnanopartikel immobilisiert und charakterisiert (**Tab. 8**).^[178] Anschließend wurden die Konjugate auf ihre inhibierenden Eigenschaften gegenüber A β untersucht (Kapitel 3.2.3).

Tab. 8: Übersicht der verwendeten Aminopyrazoltrimerderivate und deren Eigenschaften.

Ligand	Aminosäuresequenz	Summenformel	Molare Masse [g/mol]	Nettoladung (pH = 7)
Trim_5+ (46)	Trimer-KKKKCC	C ₄₅ H ₇₄ N ₂₀ O ₁₂ S	1119	+5
Trim_8+ (47)	Trimer-KKKKKKKCC	C ₆₃ H ₁₁₀ N ₂₆ O ₁₆ S	1503	+8

Eine Immobilisierung der Trimer-Derivate auf Goldnanopartikel führte bei beiden Konjugaten zu einer Erhöhung des hydrodynamischen Durchmessers. Auch das Zetapotential änderte sich vom negativen Wert (reine Goldnanopartikel) ins Positive (Konjugate). Hier konnte bei dem Liganden **47** aufgrund der höheren kationischen Ladung ebenfalls ein höheres Zetapotential gemessen werden (**Abb. 110**).

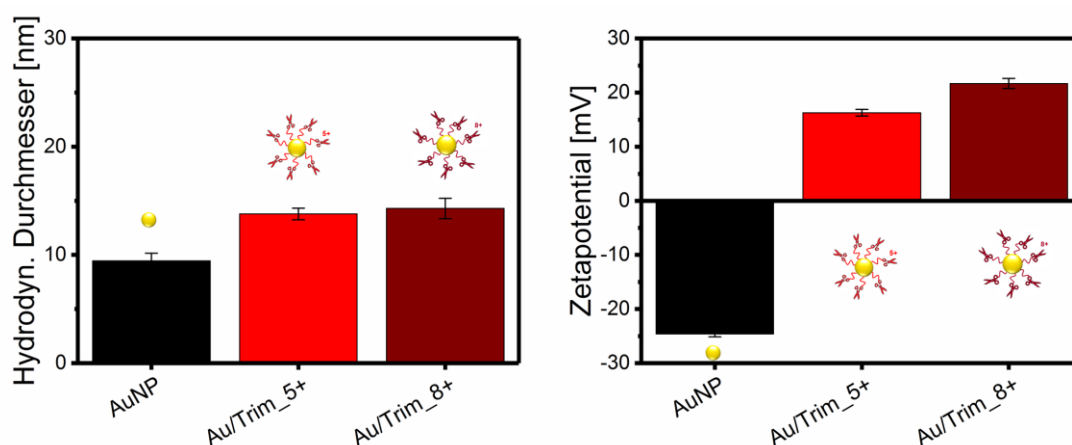


Abb. 110: Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers und des Zetapotentials von Goldnanokonjugaten nach Zugabe der Aminopyrazolliganden **46** und **47**.^[178]

Im Folgenden wurden die Konjugate auf ihre Stabilität hin getestet. Hierzu wurden Zetapotential- und UV/Vis-Messungen in Abhängigkeit des Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnisses durchgeführt. In **Abb. 111** sind die Ergebnisse der Experimente dargestellt.

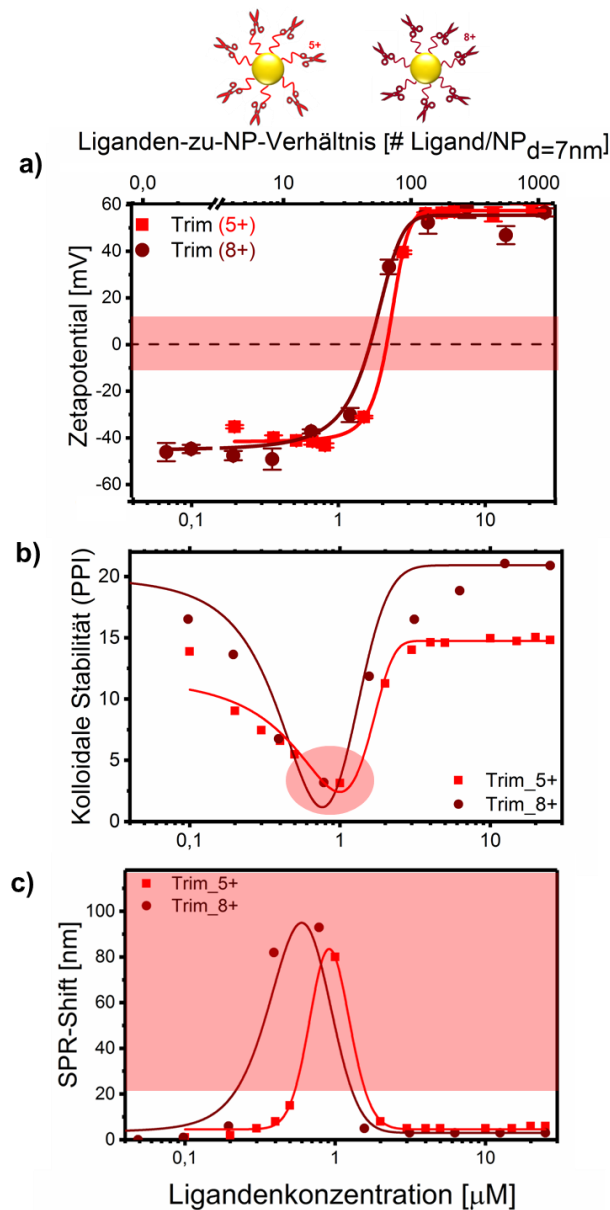


Abb. 111: Stabilitätsmessungen der Konjugate Au/Trim_5+ und Au/Trim_8+. Zetapotentialmessungen (a), Bestimmung der kolloidalen Stabilität (b) und SPR-Peakverschiebung (c) in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandenmenge für $c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$.^[178]

Stabile Konjugate konnten durch Einsatz einer hohen oder einer geringen Konzentration an positiv geladenen Aminopyrazolliganden erhalten werden (**Abb. 112**). Bei einer geringen Ligandendosis dominierte die negative Oberflächenladung der Nanopartikel, wodurch allgemein negativ geladene Konjugate erhalten wurden. Andersherum konnten allgemein positiv geladene Konjugate erhalten werden, wenn eine hohe Konzentration an Liganden eingesetzt wurde.

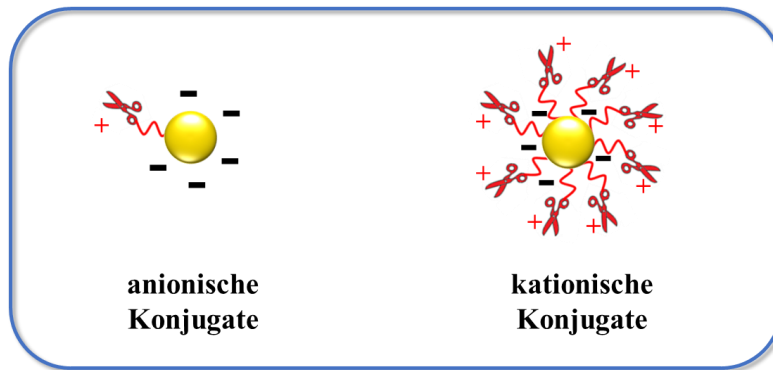


Abb. 112: Darstellung von anionischen, bzw. kationischen Trimerkonjugaten.

Das Zetapotential stabiler Konjugate sollte über +20 mV oder unter -20 mV liegen. Der rot markierte Bereich (neutral geladene instabile Konjugate) in **Abb. 111a** sollte demnach vermieden werden. Aus UV/Vis-Messungen konnte der Stabilitätsparameter PPI bestimmt werden. Bei einem hohen PPI-Wert liegen kolloidal stabile Nanopartikel vor. Auch hier kennzeichnet der rot markierte Bereich das Vorhandensein von instabilen Konjugaten (**Abb. 111b**). In dem Spektrum in **Abb. 111c** wird der SPR-Peak der Konjugate dargestellt. Auch hier zeigte das SPR-Maximum den Konzentrationsbereich, in dem instabile Konjugate vorlagen.

Weiter wurde die Ligandendichte auf der Goldnanopartikeloberfläche bestimmt. Da die verwendeten Aminopyrazolliganden UV-aktiv waren, konnte die Messung ohne zusätzliche Ligandenmodifikation durch Fluorophore durchgeführt werden. Es musste somit keine Änderung innerhalb der Ligandenstruktur erfolgen. Das ermittelte Absorptionsmaximum in dem UV/Vis-Spektrum lag bei Trim_5+ bei $\lambda = 266 \text{ nm}$ (**Abb. 113**).

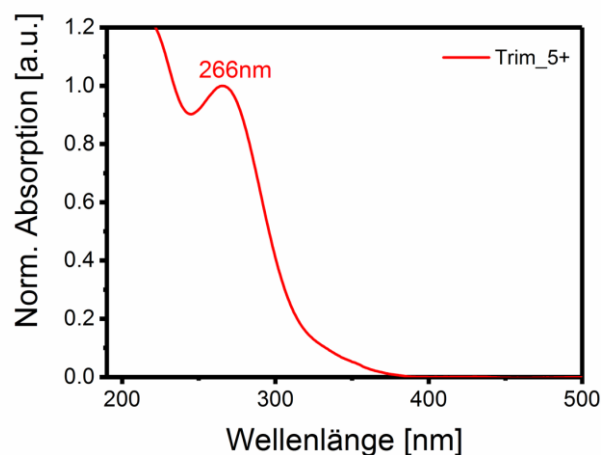


Abb. 113: Normiertes UV/Vis-Extinktionsspektrum von Trim_5+. ^[178]

Für die Bestimmung wurden die Liganden zu den Goldnanopartikeln gegeben und die Proben zentrifugiert. So konnten ungebundene Liganden von den Konjugaten getrennt werden. Der Überstand wurde daraufhin analysiert um Rückschlüsse auf die Anzahl der gebundenen Liganden auf der Nanopartikeloberfläche ziehen zu können. Die noch messbare Konzentrationsgrenze beider Derivate lag bei $0.3\ \mu\text{M}$.^[178]

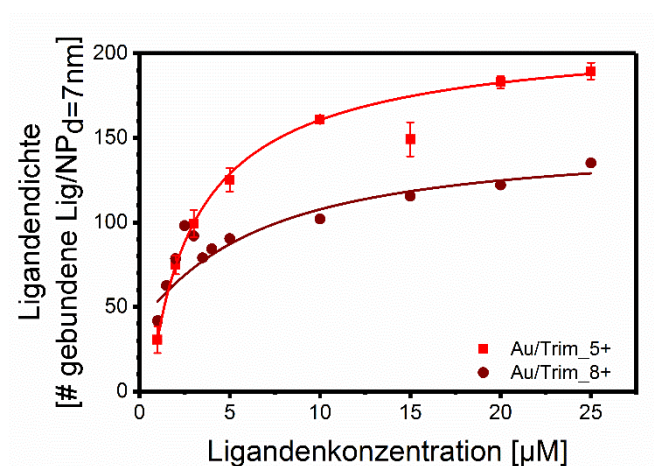


Abb. 114: Bestimmung der Ligandendichte der Trimerverbindungen (46, 47) auf Goldnanopartikeln ($c(\text{AuNP}) = 50\ \mu\text{g/mL}$).^[178]

In **Tab. 9** sind die Ergebnisse der Experimente zusammengefasst. Bei einem Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis von 418:1 konnten nur 161 Trim_5+-Liganden auf die Nanopartikeloberfläche binden. Bei den Trim_8+-Liganden lag die Ligandenmenge bei diesem Verhältnis bei 107. Wurde ein niedrigeres Ligandenverhältnis verwendet (125:1), immobilisierten nur noch 98 Liganden (Trim_5+), bzw. 73 Liganden (Trim_8+) auf der Oberfläche. Bei anionischen Konjugaten (13 Liganden/NP) konnte die Anzahl an gebundenen Liganden aufgrund der unterschrittenen Nachweisgrenze des UV/Vis-Spektrometers allerdings nicht mehr bestimmt werden.

Tab. 9: Übersicht der eingesetzten Liganden-zu-NP-Menge, der max. Anzahl an konjugierten Liganden und der Nettoladung der Konjugate mit unterschiedlichen Aminopyrazolderivaten (n.d. = nicht detektierbar).^[178]

	Konzentration [μ M]	Liganden-zu-NP-Verhältnis [#/NP]	Max. Anzahl der Liganden zur Oberflächensättigung [#/NP]	Gebundene Liganden [#/NP]	Nettoladung der Konjugate
Trim_5+	10	418	216 ± 27	161	kationisch
Trim_8+	10	418	148 ± 22	107	kationisch
Trim_5+	3	125	216 ± 27	98	kationisch
Trim_8+	3	125	148 ± 22	73	kationisch
Trim_5+	0.3	13	216 ± 27	n.d.	anionisch
Trim_8+	0.3	13	148 ± 22	n.d.	anionisch

Um sicherzustellen, dass ausreichend Liganden auf der Oberfläche immobilisierten, wurde für die nachfolgenden Funktionalitätstests ein Liganden-pro-Nanopartikel-Verhältnis von 418 zu 1 eingesetzt. Allerdings muss bei den Untersuchungsergebnissen berücksichtigt werden, dass bei diesem Verhältnis eine größere Menge ungebundener Liganden in der Lösung vorlagen (ca. 40 % (Trim_5+), bzw. 25 % (Trim_8+) ungebunden).

3.2.3 Wirkung der Au/Trim-Derivate auf A β (1-42)

Die hergestellten Trimerderivate und deren Konjugate wurden auf ihre inhibierende Wirkung bezüglich A β (1-42) untersucht. In diesem Kapitel sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Die Affinität von Au/Trim_5+ zu A β wurde mit Hilfe des fluoreszenzgelabelten A β -FITC bestimmt. Hierzu wurden unterschiedliche Goldkonjugate mit verschiedenen Ligandendichten hergestellt (Konjugate mit einem Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis von 4:1 und 418:1) und durch Fluoreszenzquenchingexperimente konnte daraufhin die Dissoziationskonstante in Abhängigkeit vom Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis bestimmt werden (**Abb. 115**)

Die Affinität der Liganden zu A β war bei anionischen Konjugaten, also 4 Liganden pro Nanopartikel, sehr stark ($K_D = 63$ nM). Wurde die Ligandendichte auf der Goldoberfläche auf 418 Liganden pro NP erhöht, erhöhte sich auch die Dissoziationskonstante der Liganden ($K_D =$

960 nM). Dies zeigte, dass durch eine dichtgepackte Ligandenoberfläche auch weniger Interaktionen zwischen den Liganden und A β möglich waren. Im Hinblick auf das Gesamtkonjugat war allerdings ein hohes Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis vorteilhafter. Hier sank die Dissoziationskonstante, wenn eine höhere Ligandenbeladung auf der Oberfläche vorlag (**Abb. 115c**). Die hergestellten anionischen Konjugate wiesen im Gegensatz zu den freien Aminopyrazolliganden eine bis zu 7-fach höhere Affinität zu A β auf. Sowohl bei den Konjugaten (4:1 und 418:1) als auch bei den freien Liganden war jedoch keine positive Kooperativität ($n > 1$) zu erkennen.

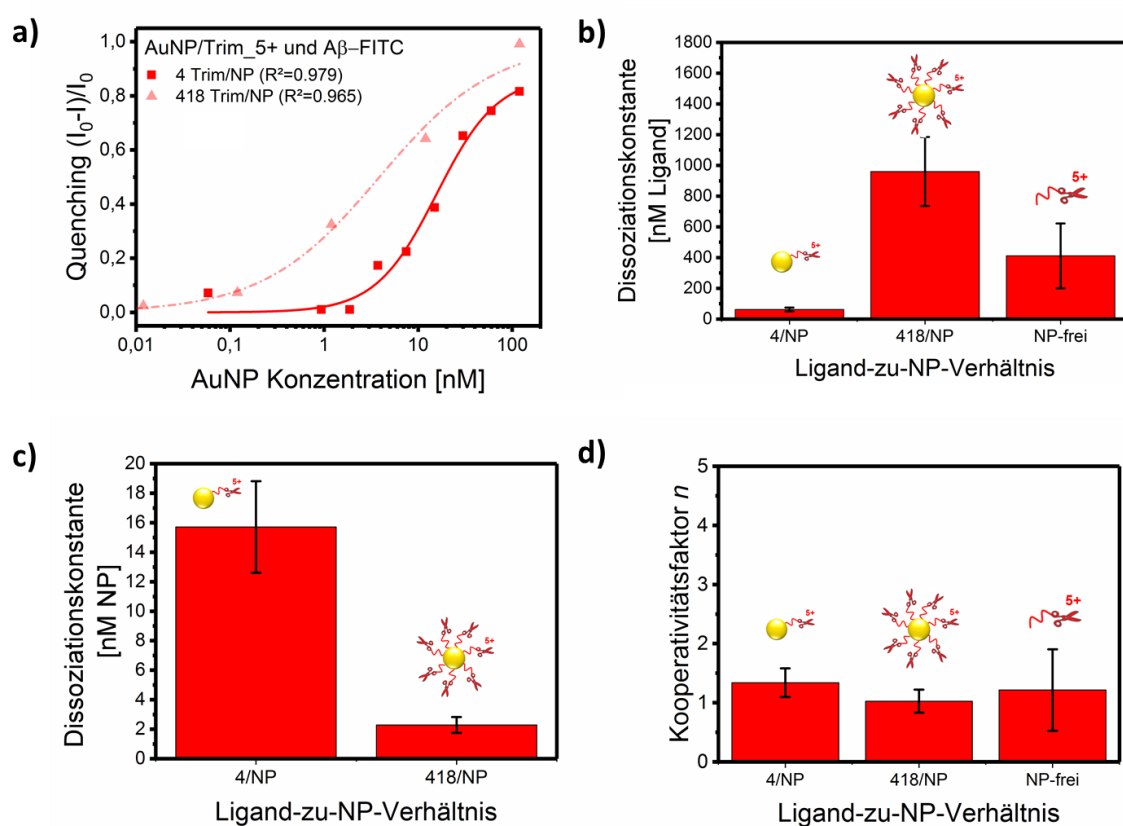


Abb. 115: Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Au/Trim_5+ mit A β -FITC durch Fluoreszenz-quenchinguntersuchungen ($c(\text{A}\beta\text{-FITC}) = 0.125 \mu\text{M}$).^[178]

Es muss bei den Konjugaten mit einem 4:1 Liganden-Nanopartikel-Verhältnis allerdings berücksichtigt werden, dass die Partikeloberfläche nicht vollständig mit Liganden besetzt war. Somit konnte auch die freie Goldnanopartikeloberfläche unspezifisch mit den A β -Fibrillen wechselwirken.

Tab. 10: Dissoziationskonstanten und die Kooperativitätsfaktoren von Trim_5+, Au/Trim_5+ und reinen Goldnanopartikeln mit A β -FITC ($c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{Ligand}) = 0.1 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$).

Ligand	K_D, Lig [nmol/L, angewandt auf D3]	K_D, NP [nmol/L, angewandt auf NP]	Kooperativitäts- faktor n
Au/Trim_5+ (0.1 μM)	62.9	15.7	1.34
Au/Trim_5+ (10 μM)	960.5	2.29	1.03
AuNP	-	2.05	5.24
Trim_5+ (10 μM)	412	-	1.22

3.2.3.1 ThT-Messungen

Die Verbindung Trim_5+ (**46**) und Trim_8+ (**47**) und die entsprechenden Nanopartikelkonjugate (Au/Liganden) wurden mittels ThT-Untersuchungen auf ihre inhibierende Wirkung gegenüber der A β -Aggregation getestet. Zunächst wurden die Substanzen auf ihre potenzielle Eigenfluoreszenz und ebenfalls auf mögliche Wechselwirkung mit dem verwendeten Thioflavin T geprüft.

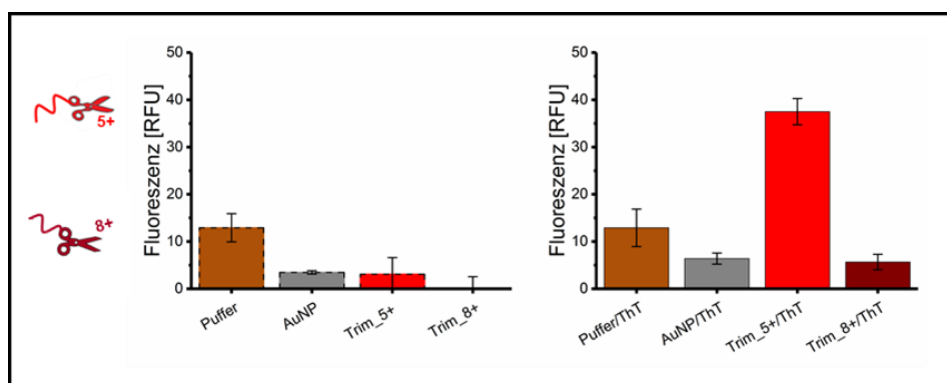


Abb. 116: Ergebnisse der Eigenfluoreszenzuntersuchungen ohne ThT (links) und möglicher Wechselwirkungen mit ThT (rechts) von reinen Nanopartikeln und der Liganden Trim_5+ und Trim_8+.

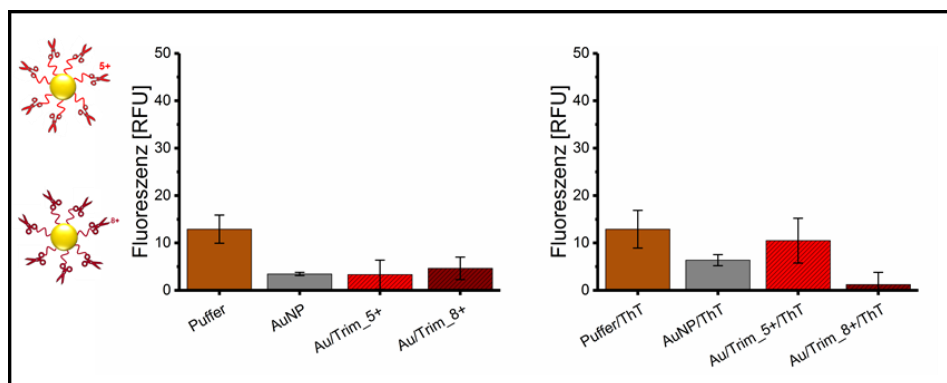


Abb. 117: Ergebnisse der Eigenfluoreszenzuntersuchungen ohne ThT (links) und möglicher Wechselwirkungen mit ThT (rechts) von reinen Nanopartikeln und der Konjugate Au/Trim_5+ und Au/Trim_8+.

Keine der getesteten Substanzen (AuNP, Ligand **46** und **47**) zeigte eine Eigenfluoreszenz oder unerwünschte Wechselwirkungen mit ThT (Abb. 116). Auch die hergestellten Konjugate waren unauffällig (Abb. 117).

Darauffolgend konnten die Substanzen auf ihre inhibierende Wirkung gegenüber A β getestet werden. Hierzu wurde ein Liganden-zu-A β -Verhältnis von 6:1 gewählt. In Abb. 118 sind die Ergebnisse der ThT-Experimente mit freien und auf Goldnanopartikel immobilisierten Trimerderivaten dargestellt. Die Werte sind in Prozent, bezogen auf die A β -Kontrolle (= 100 %) angegeben.

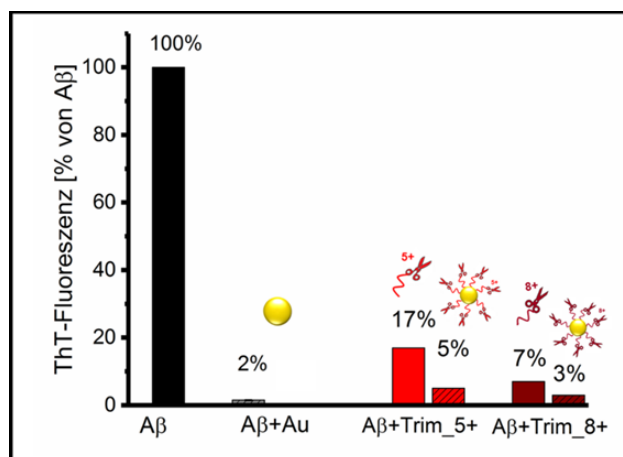


Abb. 118: Ergebnisse der ThT-Experimente von 10 μ M A β (1-42) mit reinen Goldnanopartikeln und Nanopartikeln mit Trimerderivaten (**46** und **47**). Die untersuchten Proben sind in Gruppen nach den unterschiedlichen Liganden unterteilt. Der linke Balken repräsentiert jeweils die freien Liganden (60 μ M), der rechte Balken die Liganden mit AuNP (c(AuNP) = 300 μ g/mL) (Inkubationszeit: 5 Tage bei 37 °C und 650 rpm).

Der Ligand Trim_5+ (**46**) verringerte das Fluoreszenzsignal auf 17 %, Trim_8+ (**47**) konnte das Signal sogar auf 7 % reduzieren. Die Konjugate verstärkten die aggregationsinhibierende Wirkung, Au/Trim_5+ konnte das Signal auf 5 % verringern, Au/Trim_8+ auf 3 %. Die reinen Goldnanopartikel interagierten auch hier unspezifisch mit den A β -Fibrillen.

Im Weiteren wurde die eingesetzte Ligandenkonzentration signifikant reduziert. Das Verhältnis von Ligand zu A β betrug nun 0.06:1.

Sehr niedrige Konzentrationen an Trimerliganden (0.6 μ M) zeigten in den Untersuchungen ebenfalls sehr gute Effekte gegenüber A β . Das Fluoreszenzsignal konnte durch den Liganden auf die Hälfte reduziert werden. Der Trim_8+-Ligand zeigte eine sehr starke inhibierende Wirkung, das Fluoreszenzsignal sank auf 4 %. Die immobilisierten Liganden konnten die Fluoreszenz sogar bis auf 1 % senken. Allerdings muss hier bedacht werden, dass die reinen Goldnanopartikel, wie bereits erwähnt, unspezifische Wechselwirkungen mit den A β -Fibrillen eingingen. Nanopartikeloberflächen, welche bei diesen Ligandenkonzentrationen nur mit vier Liganden besetzt waren, wiesen demnach überwiegend ligandenfreie Stellen auf, so dass hier ebenso unspezifische Interaktionen mit der Oberfläche in die Ergebnisse eingeflossen sein könnten.

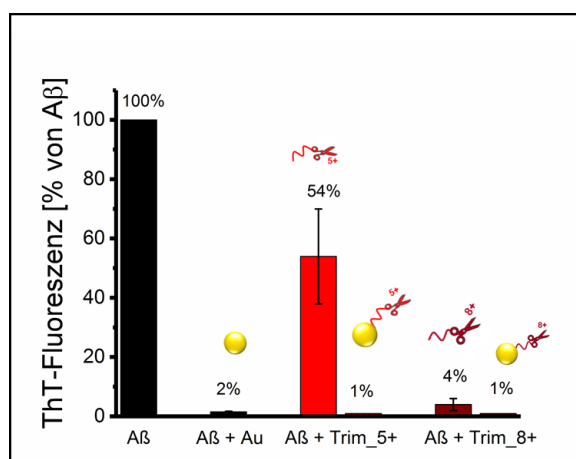


Abb. 119: Ergebnisse der ThT-Experimente von 10 μ M A β (1-42) mit den Trimerderivaten (**46** und **47**) und Nanopartikeln mit Trimerderivaten (4 Liganden pro Nanopartikel). Die untersuchten Proben sind in Gruppen nach den unterschiedlichen Liganden unterteilt. Der linke Balken repräsentiert jeweils die freien Liganden (0.6 μ M), der rechte Balken die Liganden mit AuNP (c(AuNP) = 300 μ g/mL) (Inkubationszeit: 5 Tage bei 37 °C und 650 rpm).

Ein kooperativer Effekt zwischen Ligand und Nanopartikel konnte bei niedrigen Ligandenkonzentrationen nicht eindeutig gezeigt werden, da die Ergebnisse nicht von den unspezifischen Wechselwirkungen mit der freien Goldoberfläche unterschieden werden konnten. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass trotz der mangelnden Differenzierung zwischen spezifischen und unspezifischen Interaktionen mit A β eine starke inhibierende Wirkung vorlag, da schon die freien Trim₈⁺-Liganden in sehr niedrigen Konzentrationen eine beeindruckende Reduzierung zeigen konnten und diese Wirkung durch die Immobilisierung nicht verschlechtert wurden.

Eine Immobilisierung von Aminopyrazolliganden auf Goldnanopartikel konnte demnach die aggregationsinhibierende Wirkung bei einem Liganden-zu-A β -Verhältnis von 6:1 um den Faktor 3.5 steigern. Auch 100-fach geringe Mengen an eingesetzten Liganden zeigten allein bei den freien Liganden signifikant starke inhibierende Effekte.

3.2.3.2 CD-Messungen

Mittels CD-Spektroskopieuntersuchungen konnte der Einfluss von Aminopyrazolliganden auf die Sekundärstruktur von A β untersucht werden. Die CD-Spektren wurden nach einer Inkubationszeit von 0 h, 1 h und einem Tag aufgenommen. Es wurde die Wirkung von 10 μ M Ligand auf 10 μ M A β getestet.

Zuerst wurden die reinen Liganden und Konjugate ohne A β vermessen (**Abb. 120**). Sowohl die freien Liganden als auch die Konjugate zeigten bei den Ergebnissen keine ausgeprägten Banden im CD-Spektrum. Ein leicht positiver Cotton-Effekt ist bei allen Proben bei 300 nm zu beobachten.

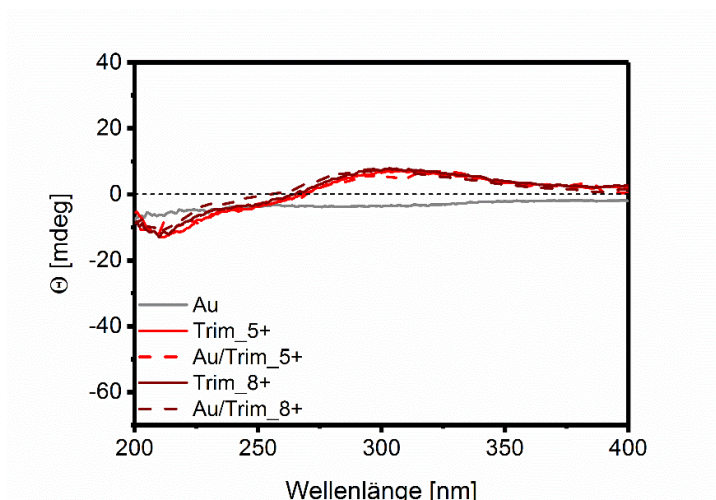


Abb. 120: CD-Spektren der getesteten Trimerliganden und Trimerkonjugate ohne Aβ(1-42)-Peptid.

Weiter wurde die Wirkung der Liganden und Konjugate auf 10 μM Aβ untersucht. Die aufgenommenen Ligandenspektren (bzw. Konjugatspektren) wurden von den entsprechenden Aβ-Ligandenspektren (Aβ-Konjugatspektren) subtrahiert. Ebenfalls wurde zum Vergleich in jedes ausgewertete Spektrum ein CD-Spektrum von Aβ(1-42) nach 24 h Aggregationszeit abgebildet. **Abb. 121** zeigt den Einfluss von Trim_5+ (**46**) auf die Sekundärstruktur von Aβ. Nach 24 h konnte eine Verringerung der charakteristischen β-Faltblattbande bei 220 nm beobachtet werden. Allerdings konnte die Intensität der negativen Bande mit dem freien Liganden nur halbiert werden. Das Konjugat (Au/Trim_5+) hingegen löste die Bande nach 24 Stunden fast komplett auf. Zusätzlich trat mit dem Konjugat nach einer langen Inkubationszeit ein induzierter CD-Effekt bei ca. 280 nm auf. Das neue Maximum wurde in vorherigen Arbeiten ebenfalls bei unterschiedlichsten Trimerliganden beobachtet. Hier entstand der induzierte CD-Effekt durch eine Komplexbildung des Liganden in die Phenylalanintasche von Aβ. Es bildete sich ein stabiler Komplex mit dem Alzheimerpeptid, was auch durch MD-Rechnungen gestützt werden konnte.^[86]

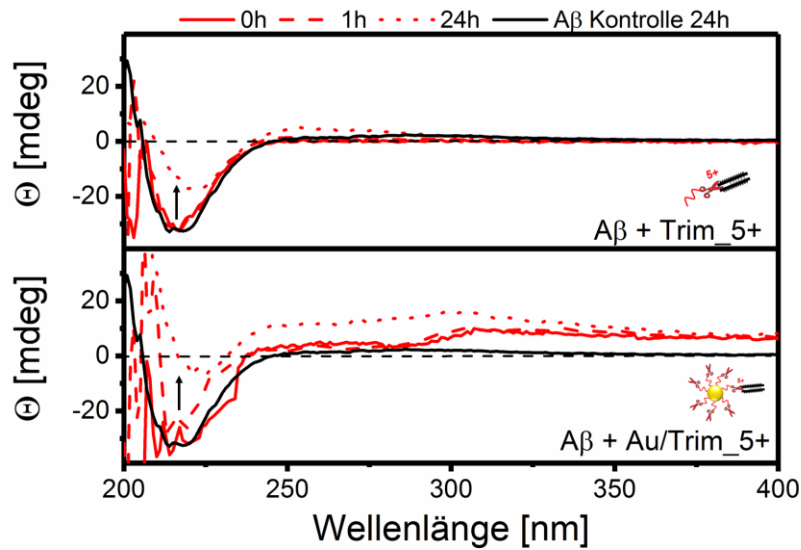


Abb. 121: CD-Spektren über 24 h von A β als Referenz (schwarz) und mit Trim_5+ (oben) und Au/Trim_5+ (unten) inkubiert ($c(\text{A}\beta) = 10 \mu\text{M}$; $c(\text{Ligand}) = 10 \mu\text{M}$, $c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$).

Die Verbindung Trim_8+ und auch Au/Trim_8+ konnten die β -Faltblattstruktur von A β hingegen stark destabilisieren. Hier wurde die spezifische Bande bei 220 nm jeweils bereits nach 1 h Inkubationszeit aufgelöst (Abb. 122).

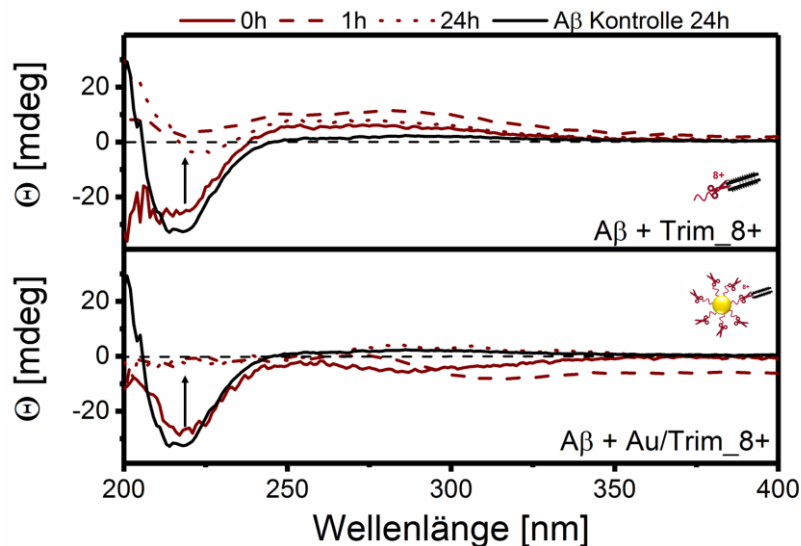


Abb. 122: CD-Spektren über 24 h von A β als Referenz (schwarz) und mit Trim_8+ (oben) und Au/Trim_8+ (unten) inkubiert ($c(\text{A}\beta) = 10 \mu\text{M}$; $c(\text{Ligand}) = 10 \mu\text{M}$, $c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$).

Zusätzlich wurden Experimente beider Trimerliganden (Trim_5+ und Trim_8+) in sehr geringen Konzentrationen ($0.1 \mu\text{M}$ Ligand bei $10 \mu\text{M}$ A β) durchgeführt. Allerdings zeigten die Ergebnisse, dass die freien Liganden bei dieser Konzentration nur einen sehr geringen destabilisierenden Einfluss auf die β -Faltblattkonformation von A β (Abb. 123, Abb. 124) ausüben

konnten. Das entsprechende anionische Konjugat reduzierte nach 24 h Inkubationszeit die Bandenintensität bei 220 nm um die Hälfte. Goldnanopartikel alleine zeigten in vorherigen Tests keine Wirkung auf die Sekundärstruktur des A β -Peptids. Daraus resultiert, dass in diesen Untersuchungen nicht die unbesetzten Nanopartikeloberflächen eine Wirkung auf die A β -Konformation hatten. Die beobachtete Verringerung der Bandenintensität konnte daher nur durch die geringe Ligandenmenge auf den Goldnanopartikeln hervorgerufen werden.

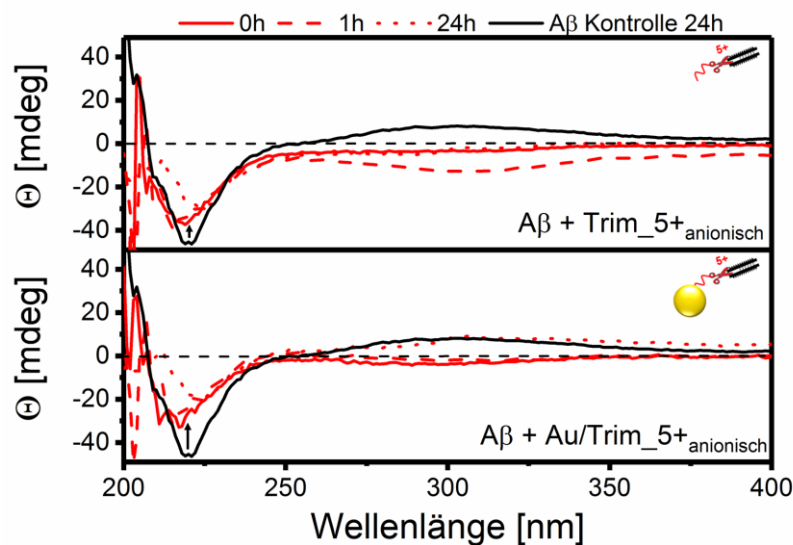


Abb. 123: CD-Spektren über 24 h von A β als Referenz (schwarz) und mit Trim_5+ (oben) und Au/Trim_5+ (unten) inkubiert ($c(\text{A}\beta) = 10 \mu\text{M}$; $c(\text{Ligand}) = 0.1 \mu\text{M}$, $c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$).

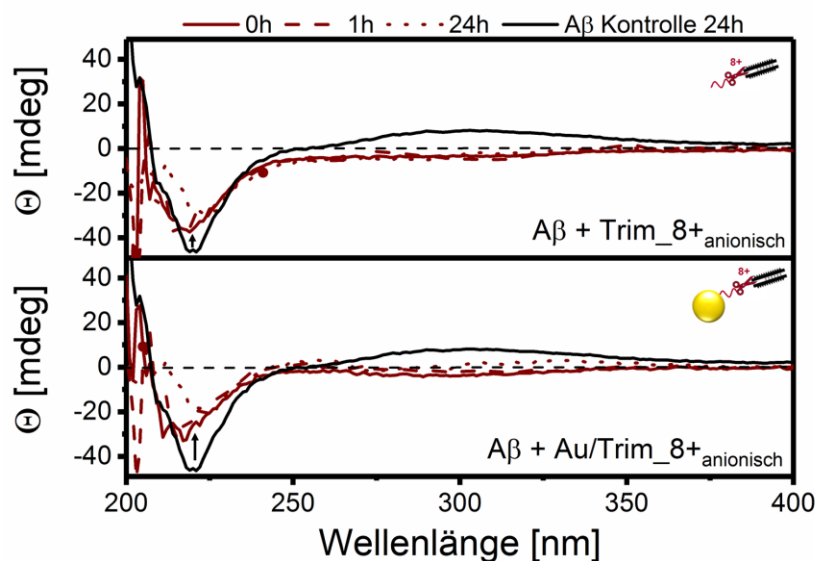


Abb. 124: CD-Spektren über 24 h von A β als Referenz (schwarz) und mit Trim_8+ (oben) und Au/Trim_8+ (unten) inkubiert ($c(\text{A}\beta) = 10 \mu\text{M}$; $c(\text{Ligand}) = 0.1 \mu\text{M}$, $c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$).

Beide Trimer-Derivate destabilisierten die β -Faltblattstruktur von A β . Nach kurzer Inkubationszeit konnte die charakteristische Bande bei 220 nm in CD-Spektren durch die Liganden aufgelöst werden. Die Konjugate zeigten eine ähnliche Wirkung, teilweise konnte die Konformationsänderung des A β -Peptids beschleunigt werden. Auch die anionischen Au/Trim-Konjugate (4 Liganden pro NP) konnten die Menge an β -Faltblattstrukturen in der Probe verringern und die Bandenintensität in den entsprechenden CD-Spektren halbieren.

3.2.3.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Für die Visualisierung der A β -Fibrillen mittels Rasterkraftmikroskopie wurde A β zuerst vorinkubiert, dann mit den Liganden versetzt und nach einer weiteren Inkubationszeit untersucht. Rasterkraftmikroskopiebilder wurden jeweils nach einem und sieben Tagen Inkubationszeit aufgenommen. Die verwendeten Konzentrationen waren für diese Experimente $c(\text{AuNP}) = 125 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{Ligand}) = 25 \mu\text{M}$ und $c(\text{A}\beta) = 50 \mu\text{M}$.

In **Abb. 125** sind die entstandenen AFM-Aufnahmen der einzelnen Proben (A β als Referenz, A β mit Goldnanopartikeln, mit Trim_5+ oder mit Au/Trim_5+ inkubiert) abgebildet. Im Vergleich zu der Referenzprobe konnte die Menge an A β -Fibrillen schon nach einem einzigen Inkubationstag sowohl mit dem freien Liganden, als auch mit dem Konjugat sichtbar verringert werden.

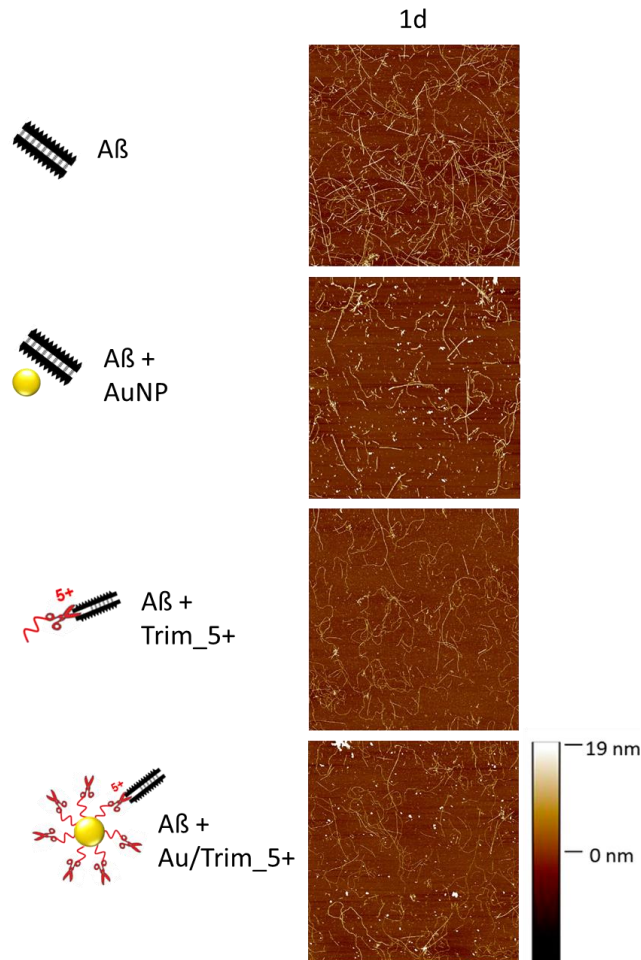


Abb. 125: AFM-Aufnahmen von Aβ-Fibrillen nach einer Inkubationszeit von 24 h. Aβ wurde zusätzlich mit reinen AuNPs, Trim_5+ und Au/Trim_5+ inkubiert. Die Proben wurden vor der AFM-Aufnahme 1:20 verdünnt ($c(\text{AuNP}) = 125 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{Ligand}) = 25 \mu\text{M}$, $c(\text{A}\beta) = 50 \mu\text{M}$).^[178]

Die Auswertung der prozentualen Oberflächenbedeckung der AFM-Bilder ist in einem Balkendiagramm zusammengefasst (**Abb. 126**). Nach 24 h Inkubationszeit lag die Oberflächenbedeckung in der Referenzprobe bei 19 %, dies änderte sich nicht durch eine Inkubation mit reinen Goldnanopartikeln. Die reinen Nanopartikel hatten demnach keinen Einfluss auf die bestehenden Fibrillen und auch keinen inhibierenden Einfluss auf die weitere Fibrillenbildung. Die Inkubation mit Trim_5+ und dem Konjugat Au/Trim_5+ verringerte die Fibrillenbedeckung in beiden Fällen auf 13 %.

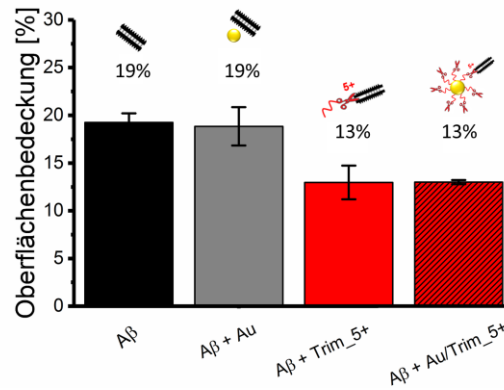


Abb. 126: Auswertung der prozentualen Oberflächenbedeckung von Aβ bei den aufgenommenen AFM-Bildern.^[178]

Nach 24 h Inkubationszeit konnte somit ein inhibierender Effekt der Trim_5+-Verbindung gezeigt werden. Die Wirkung steigerte sich allerdings nicht durch die Immobilisierung des Liganden auf Goldnanopartikel.

Zusätzlich wurden weitere AFM-Bilder nach einer Inkubationszeit von einer Woche aufgenommen. In **Abb. 127** sind die entstandenen AFM-Bilder dargestellt. Es war erneut eine Verringerung der Aβ-Fibrillen durch den Liganden Trim_5+, bzw. durch das Konjugat zu beobachten. Auch hier schien kein synergistischer Effekt durch die Immobilisierung aufzutreten.

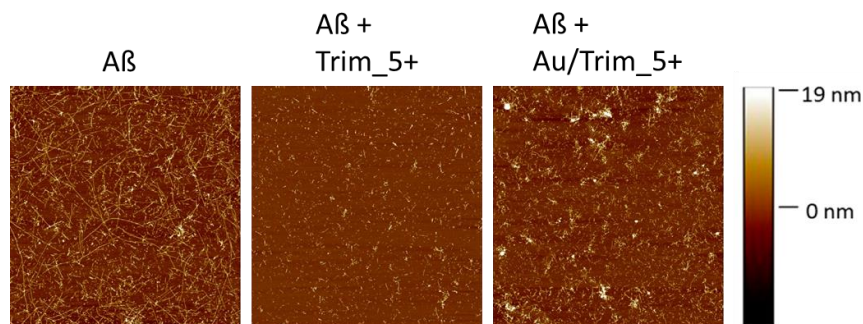


Abb. 127: AFM-Aufnahmen von Aβ-Fibrillen nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen. Aβ wurde zusätzlich mit Trim_5+ und Au/Trim_5+ inkubiert. Die Proben wurden vor der AFM-Aufnahme 1:20 verdünnt ($c(\text{AuNP}) = 125 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{Ligand}) = 25 \mu\text{M}$, $c(\text{A}\beta) = 50 \mu\text{M}$).^[178]

Ebenfalls konnte bei den AFM-Aufnahmen die Höhe und die Länge der entstandenen A β -Fibrillen ausgewertet werden. In **Abb. 128** sind die Ergebnisse in einem Balkendiagramm zusammengefasst. Die Auswertung erfolgte nach einer Inkubationszeit von einem und sieben Tagen.

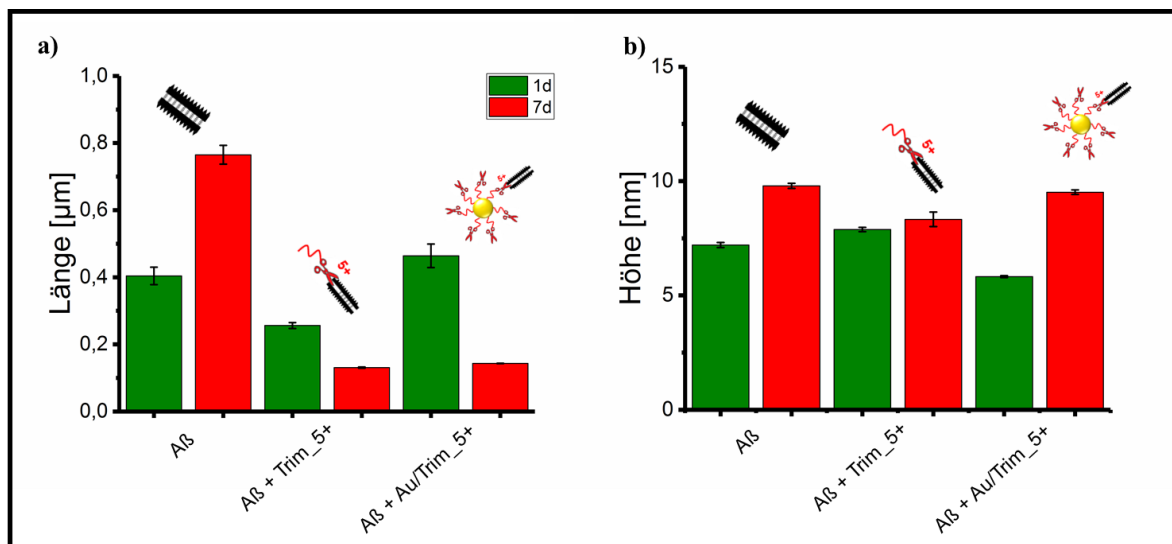


Abb. 128: Auswertung der A β -Fibrillenlänge und -höhe in den Proben mit Trim_5+ und Au/Trim_5+. A β ohne Ligandenzugabe diente als Referenzprobe ($c(\text{A}\beta) = 50 \mu\text{M}$, $c(\text{AuNP}) = 125 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{Ligand}) = 7.5 \mu\text{M}$). Die AFM-Bilder wurden nach einem und sieben Tagen Inkubationszeit aufgenommen und ausgewertet.^[178]

Nach einer Inkubationsdauer von 24 h hatten sich in der Referenzprobe Fibrillen mit einem Durchmesser von 7.2 nm und einer Länge von 400 nm gebildet. Eine Inkubation der Proben mit Trim_5+ verringerte die Höhe der Fibrillen nicht, jedoch bildeten sich kürzere Fibrillen, bzw. verkürzten sich die vorliegenden Fibrillen auf 250 nm (Länge reduzierte sich auf 63 %, bezogen auf die Referenzprobe). Bei einer Inkubation mit Au/Trim_5+ bildeten sich zwar dünnere Fibrillen (Durchmesser: 5.8 nm), allerdings waren diese Fibrillen um 15 % länger als die Referenz (460 nm lange Fibrillen).

Die Fibrillen in der Referenzprobe konnten sich nach sieben Tagen Inkubationszeit auf eine Länge von 760 nm und einem Durchmesser von 9.8 nm vergrößern. Der freie Ligand Trim_5+ (**46**) konnte den Durchmesser auf 85 % verringern (8.3 nm) und es lagen nur noch sehr kurze Fibrillen (130 nm) vor. Das Konjugat hatte ebenfalls diese starke Wirkung auf die Fibrillenbildung: Hier verringerte sich der Durchmesser auf 9.5 nm, die Fibrillenlänge konnte signifikant reduziert werden (140 nm). In **Tab. 11** sind die Ergebnisse noch einmal zusammengefasst (Referenzprobe = 100 %).

Tab. 11: Auswertung der Fibrillenmorphologie bei den erhaltenen AFM-Bildern.

	Fibrillenhöhe		Fibrillenlänge	
	nach 1 Tag	nach 7 Tagen	nach 1 Tag	nach 7 Tagen
Referenz Aβ	100 %	100 %	100 %	100 %
Aβ + Trim_5+	109 %	85 %	63 %	17 %
Aβ + Au/Trim_5+	81 %	97 %	115 %	19 %

In den AFM-Bildern zeigte sich sowohl durch eine Inkubation mit dem freien Trimerliganden, als auch durch eine Inkubation mit dem Konjugat eine Verringerung der Fibrillenmenge. Eine Veränderung in der Fibrillenmorphologie wurde in beiden Proben (Trim_5+ und Au/Trim_5+) nach siebentägiger Inkubation beobachtet.

3.2.3.4 Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) und enzymgekoppelter Immunsorptions-test (ELISA)

Die Verbindungen Trim_5+ und Au/Trim_5+ wurden jeweils mit A β 24 h inkubiert und anschließend die in der Probe entstandenen A β -Spezies mittels DGZ nach ihrer Größe und Form getrennt. Der Nachweis der verschiedenen A β -Strukturen erfolgte mittels ELISA-Untersuchungen. Es wurde ein Liganden-zu-A β -Verhältnis von 1:1 gewählt.

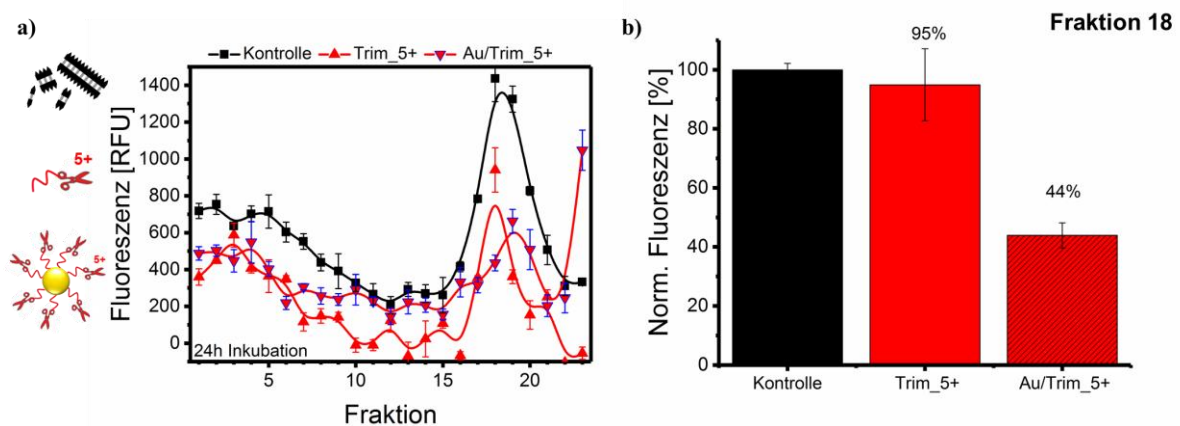


Abb. 129: Quantifizierung der A β -Spezies in den Fraktionen der DGZ mittels ELISA. Übersicht über den Einfluss der reinen AuNPs, Trim_5+ und Au/Trim_5+ auf A β nach 24 h Inkubationszeit bei 37 °C (a) ($c(\text{AuNP}) = 200 \mu\text{g/mL}$; $c(\text{Ligand}) = 40 \mu\text{M}$; $c(\text{A}\beta) = 40 \mu\text{M}$). Das Balkendiagramm zeigt den Gehalt an A β in der Referenzprobe und den Einfluss der Substanzen Trim_5+ und Au/Trim_5+ auf den Fibrillenanteil in der jeweils 18. Fraktion (b).

Nach 24 h konnte die typische Verteilung der A β -Strukturen in der Kontrollprobe beobachtet werden (**Abb. 129a**). In den vorderen Fraktionen (Fraktionen 0-14) befanden sich wenig Monomere, Dimere und kleine Oligomere. Durch die lange Inkubationszeit konnten sich allerdings sehr viele Protofibrillen und reife Fibrillen ausbilden, die in den Fraktionen 15-20 sammelten. Sowohl der freie Ligand Trim_5+, als auch das Konjugat Au/Trim_5+ verringerten den Anteil der großen Fibrillen in diesen Fraktionen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Substanzen ist in der Fraktion 18 zu beobachten. Bei der Kontrollprobe sammelte sich hier die höchste Menge an A β . Im Vergleich zeigte eine Inkubation mit dem freien Trimerliganden kaum eine Verringerung der Menge an reife Fibrillen (95 % Fibrillen vorhanden), wohingegen eine Inkubation mit dem Konjugat den Fibrillenanteil in dieser Fraktion um über die Hälfte (auf 44 %) reduzieren konnte (**Abb. 129b**).

3.2.3.5 Zellkulturassay und Mikroskopie der Zellen

Die Wirkung des Aminopyrazolliganden auf *in vivo* exprimiertes A β wurde in Zellkulturexperimenten untersucht. Die Zellen wurden mit Goldnanopartikeln, freiem Trim_5+-Liganden und Au/Trim_5+ inkubiert. Als Positivkontrolle diente der γ -Sekretaseinhibitor LY411575, welcher die A β -Produktion vollständig verhinderte. Die Goldnanopartikel zeigten eine unspezifische Wechselwirkung mit A β und reduzierten die Menge an 10-15 kDa großen A β -Spezies im Zellmedium auf 51 %. Der Ligand Trim_5+ reduzierte die Menge an A β hingegen auf 36 %, eine gesteigerte Wirksamkeit zeigte die Verbindung, wenn sie auf Gold immobilisiert wurde (Reduktion auf 29 %) (**Abb. 130**).

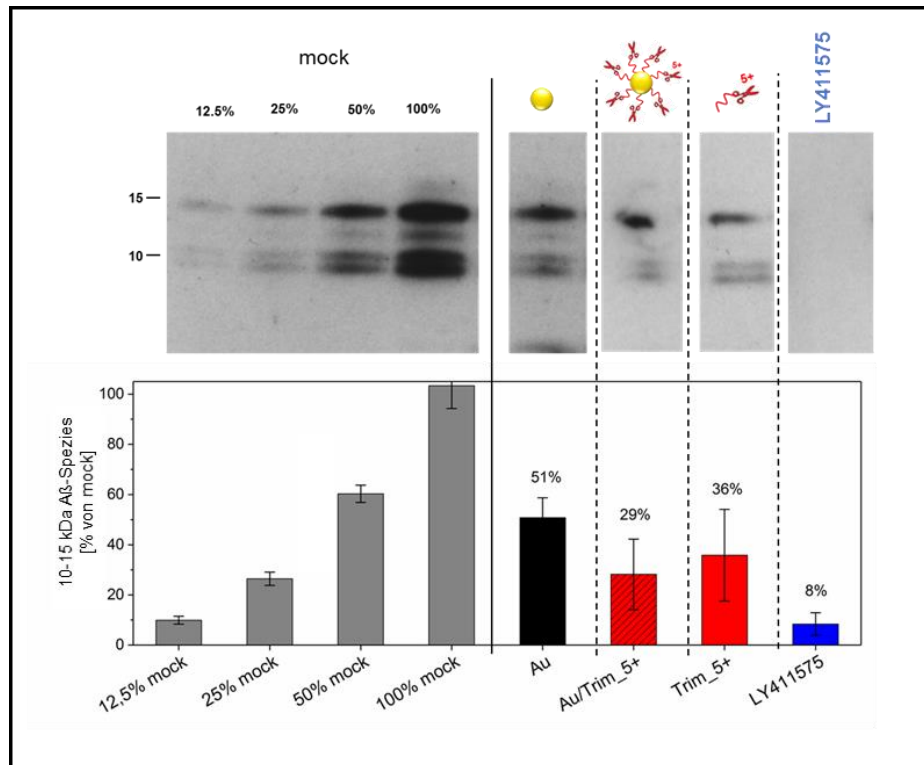


Abb. 130: Ergebnisse der Wirkung des Trim_5+-Liganden und des Konjugats im Zellkulturassay auf 10-15 kDa große Aβ-Spezies ($c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$; $c(\text{Ligand}) = 10 \mu\text{M}$; 418 Liganden/NP). Als Kontrolle diente der γ -Sekretaseinhibitor LY411575 (20 nM). Dargestellt sind die mittleren Signalintensitäten relativ zur Kontrolle (mock).

Zusätzliche Mikroskopieaufnahmen der Zellen zeigten nach vier Tagen Inkubation mit den Liganden, bzw. mit den Konjugaten keine negative Beeinflussung des Zellwachstums (**Abb. 131**). Die Nanopartikelkonjugate lagerten sich in den Zellen an, beeinträchtigten jedoch nicht die Zellviabilität (**Abb. 133**).

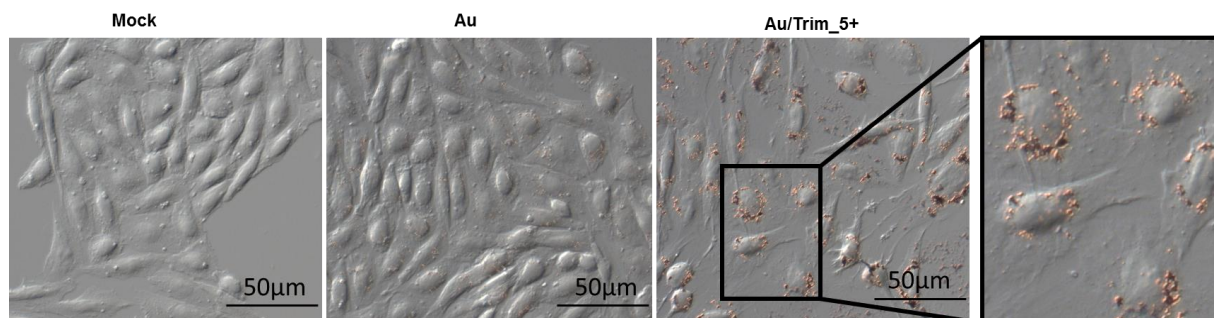


Abb. 131: Lichtmikroskopieaufnahmen der CHO-Zellen nach einer Inkubationszeit von vier Tagen.

Neben einem 418:1 Liganden-zu-NP-Verhältnis wurden noch weitere Verhältnisse (125:1 und 4:1) untersucht. Hierbei wurden statt 10 μM Ligand, nur noch 3 μM , bzw. 0.1 μM Ligand bei gleichbleibender Goldkonzentration verwendet. In **Abb. 132** sind die Ergebnisse abgebildet.

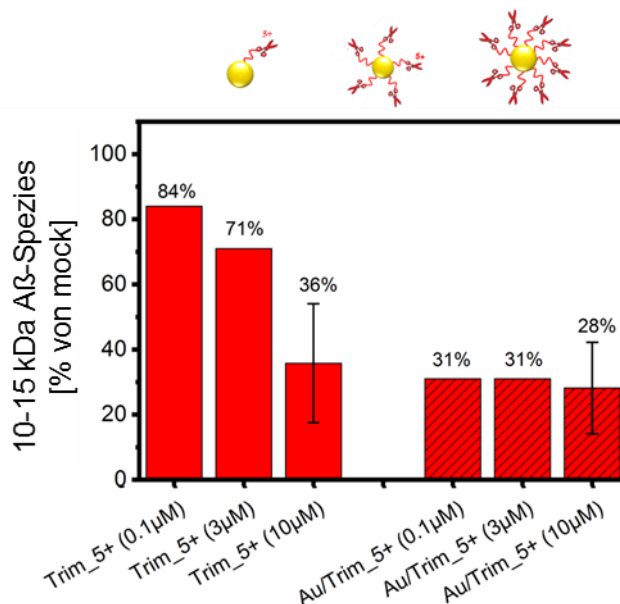


Abb. 132: Ergebnisse der A β -Reduktion im Zellmedium durch Inkubation mit unterschiedlichen Trim_5+-Konzentrationen und den entsprechenden Konjugaten (4 Liganden/NP bei $c = 0.1 \mu\text{M}$; 125 Liganden/NP bei $c = 3 \mu\text{M}$; 418 Liganden/NP bei $c = 10 \mu\text{M}$, $c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$).

Bei den freien Trim_5+-Liganden (**46**) zeigte die höchste Ligandenkonzentration auch die größte Wirkung. Hier konnte die Menge an A β im Zellmedium auf 36 % reduziert werden, geringere Konzentrationen an Trim_5+ konnten die Menge nur auf 71-84 % senken. Die Konjugate zeigten eine gesteigerte Wirkung im Vergleich zu den freien Liganden. Es konnte bei allen Konjugaten, unabhängig von der immobilisierten Ligandenmenge, eine Reduktion auf ca. 30 % beobachtet werden. Bei Verwendung von hohen Ligandenkonzentrationen konnten noch viele ungebundene Trimerliganden in der Lösung mit A β wechselwirken. Demnach war hier kaum eine gesteigerte Wirkung zwischen freien Liganden und Konjugaten zu beobachten. Bei Einsatz von sehr geringen Mengen an Trimerligand auf Nanopartikel (und keinen freien Liganden in der Lösung) konnte hingegen durch die Immobilisierung eine gesteigerte Wirkung um den Faktor 2.7 erzielt werden.

Die untersuchten Proben beeinträchtigten selbst in hohen Konzentrationen (10 μM Ligandenkonzentration) die Viabilität der CHO-Zellen nicht. Die Proteinkonzentration im Zelllysate wurde durch die Inkubation mit den Testsubstanzen nicht verändert (**Abb. 132**).

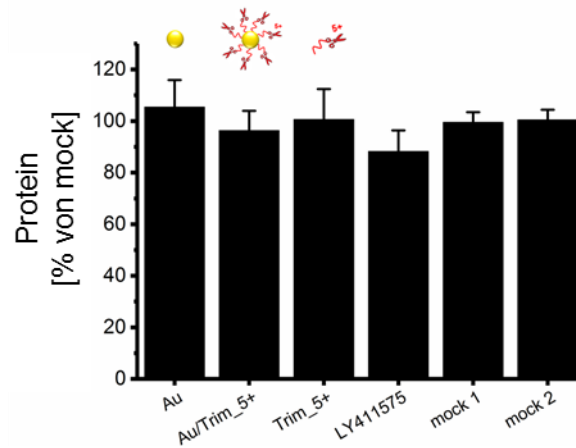


Abb. 133: Ergebnisse der Proteinkonzentrationen in den Zelllysaten nach einer Inkubation mit AuNPs, Au/Trim_5+ und Trim_5+.

Auch wurde keine Apoptose der Zellen beobachtet. Die APP-Expression wurde durch den Aminopyrazolliganden, bzw. durch das entsprechende Konjugat ebenfalls nicht gehindert (Abb. 134).

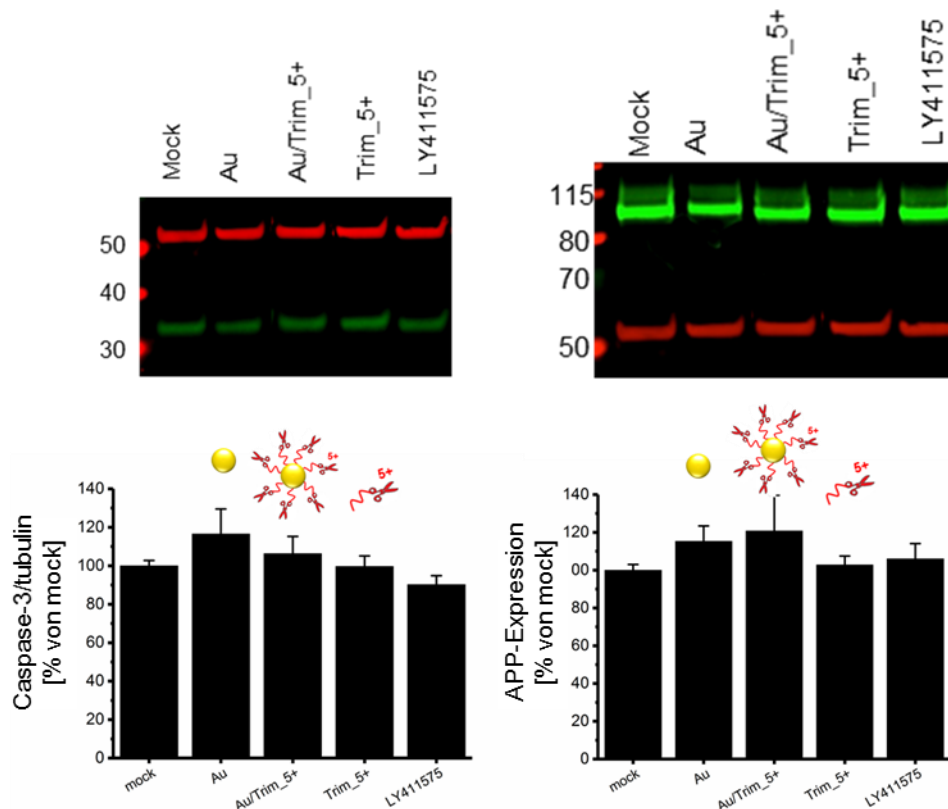


Abb. 134: Auswertung des Caspase-3-Assays (links: Caspase-3 grün, Tubulin rot) und der APP-Produktion der CHO-Zellen nach einer Inkubation mit AuNPs, Au/Trim_5+ und Trim_5+ (rechts: APP grün, Tubulin rot).

Es stellte sich heraus, dass Trim_5+ und Au/Trim_5+ keine neurotoxischen Einflüsse auf die CHO-Zellen besaßen. Die Verbindungen reduzierten allerdings die *in vivo* exprimierte A β -Menge im Zellmedium auf 29-36 %. Eine gesteigerte Wirksamkeit konnte durch Immobilisierung der Liganden auf Goldnanopartikel gezeigt werden. Hier konnten selbst sehr geringe Mengen des Liganden (4 Liganden pro NP) die A β -Menge auf 30 % reduzieren.

3.2.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden die Ergebnisse der neuen β -faltblattbrechenden Aminopyrazoleinheit zusammengefasst. Es konnten Trimerderivate mit 5- und 8-fach positiver Ladung (Trim_5+ und Trim_8+) synthetisiert und auf Goldnanopartikel immobilisiert werden. Mittels unterschiedlicher Ligandenkonzentration konnten sowohl stabile kationische Konjugate (418:1 Liganden pro Nanopartikel), als auch stabile anionische Konjugate mit sehr wenig Liganden pro Nanopartikel (4:1) hergestellt werden. Die Ligandenbelegung auf den Goldnanopartikeln war bei gleichem Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis bei Trim_5+ dichter (max. 161 Liganden gebunden/NP) als bei Trim_8+ (max. 107 Liganden gebunden/NP). Die Differenz resultierte durch die höheren elektrostatischen Wechselwirkungen, da Trim_8+ in seiner Struktur drei zusätzliche positiv geladene Lysine aufweisen konnte. Die Trim_8+-Liganden stießen sich demnach stärker voneinander ab als die Trim_5+-Liganden.

Die Dissoziationskonstante K_D zeigte bei den Trimerkonjugaten eine 7-fach stärkere Affinität zu A β als die der freien Trimerverbindungen. Je höher die Ligandendichte auf dem Nanopartikel war, desto niedriger war die Dissoziationskonstante der Konjugate. Es war allerdings bei keinem Trimerderivat oder Konjugat ein positiver Kooperativitätsfaktor vorzufinden. Die vorherige Bindung eines A β -Liganden begünstigte somit keine Bindung von weiterem A β .

In ThT-Untersuchungen konnten signifikant inhibierende Effekte beobachtet werden: Trim_5+ reduzierte das Fluoreszenzsignal als freier Ligand, eine gesteigerte Wirkung des Liganden wurde durch die Immobilisierung auf Goldnanopartikeln erreicht. Hier konnten die Konjugate das Fluoreszenzsignal noch einmal um den Faktor 3.4 senken. Der Ligand Trim_8+ zeigte eine noch stärkere Wirkung. Der freie Ligand reduzierte das Signal sehr effektiv, durch die Immobilisierung zum entsprechenden Goldkonjugat konnte das Fluoreszenzsignal nahezu vollständig reduziert werden. In weiteren Experimenten wurde die Ligandenkonzentration um das 100-fache erniedrigt, so dass nur noch 0.6 μ M Trimerligand auf 10 μ M A β wirken konnte. Selbst in

sehr geringer Konzentration konnte Trim_8+ die Fluoreszenzintensität auf 4 % senken, gebunden war nahezu keine Fluoreszenz mehr zu detektieren (Trim_5+ frei 54 %, gebunden 5 %). Obwohl bei den anionischen Konjugaten eine unspezifische Wechselwirkung zwischen den A β -Fibrillen und noch unbesetzter Goldnanopartikeloberfläche nicht ausgeschlossen werden konnte, zeigte der freie Trim_8+-Ligand in substöchiometrischen Konzentration einen sehr starken inhibierenden Einfluss, der durch eine Immobilisierung der Liganden auf die Nanopartikeloberfläche nicht abgeschwächt wurde.

In CD-Experimenten konnte Trim_5+ die Sekundärstruktur von A β nur schwach beeinflussen, selbst nach 24 h wurde die negative Bande bei 220 nm nur um die Hälfte reduziert. Auf Goldnanopartikeln immobilisiert wirkte der Ligand effektiver und löste die Bande nach gleicher Inkubationszeit vollständig auf. Die Erhöhung der positiven Ladung innerhalb der Ligandenstruktur von 5+ auf 8+ zeigte auch in diesen Experimenten eine stärkere Wirkung auf A β . Nach bereits einer Stunde konnte Trim_8+ sowohl als freier Ligand, als auch als gebundener Ligand die β -Faltblattkonformation des A β -Peptids vollständig destabilisieren. Bei geringen Konzentrationen ($c(\text{Ligand}) = 0.1 \mu\text{M}$) zeigten beide freien Trimerliganden keinerlei Einfluss auf den negativen Cotton-Effekt bei 220 nm, erst das entsprechende Konjugat konnte die molare Elliptizität nach 24 h halbieren.

Bei der Auswertung der AFM-Bilder zeigten freie Goldnanopartikel keine Reduzierung der A β -Fibrillen, die getesteten Proben Trim_5+ und Au/Trim_5+ hingegen schon. Es konnte zwar kein Unterschied in der Wirkung zwischen freien und gebundenen Liganden beobachtet werden, jedoch wurde die Oberflächenbedeckung in beiden Fällen nach 24 h gleich stark von 19 % (A β -Referenzprobe ohne Ligandenzusatz) auf 13 % reduziert.

Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit der Proben, die A β und entweder freie oder gebundenen Trim_5+-Liganden enthielten, wurden die gebildeten A β -Spezies mittels DGZ aufgetrennt und anschließend die Verteilung in den einzelnen Fraktionen durch einen ELISA detektiert. Hier zeigte sich besonders in Fraktion 18 ein großer Unterschied bei den Testsubstanzen. Während die freien Liganden kaum eine Wirkung auf die Fibrillenausbildung hatten (noch 95 % A β vorhanden), konnten die Konjugate den Anteil in der Fraktion auf 44% reduzieren.

Bei *in vivo* exprimiertem A β (10-15 kDa große A β -Spezies) konnten die Trimerderivate ebenfalls ihren starken Einfluss beweisen. Die freien Liganden reduzierten die Menge an A β im Zellmedium auf 36 %, die Konjugate auf 29 %. Bei einem anderen Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis von 125:1 zeigten die freien Liganden eine geringere Wirkung (71 %), die Konjugate behielten allerdings ihre Effektivität (31 %). Wurde die eingesetzte Ligandenkonzentration um den Faktor 30 verringert, konnte immer noch eine schwache Wirkung der freien Liganden

(84 %) und eine vergleichsweise sehr starke Wirkung der gebundenen Liganden (31 %) beobachtet werden. Keine der getesteten Substanzen hatte einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum. Die Proteinmenge in den Lysaten war gleichbleibend, so dass größere toxische Einflüsse ausgeschlossen werden konnten. Auch die APP-Produktion wurde durch die Behandlung der Zellen mit Trimerliganden nicht verändert.

Eine besondere Eigenschaft der Aminopyrazolliganden ist es bekanntlich, dass sie durch ihr spezielles D-A-D-Bindungsmotiv fehlgefaltete Peptide komplexieren und so die Aggregation von A β hemmen können. Auch durch die Immobilisierung der Aminopyrazolliganden auf Nanopartikel änderte sich die Wirkfunktion der Liganden nicht. Es konnte sogar eine gesteigerte Wirkung aufgrund der hohen lokalen Ligandenkonzentration auf den Nanopartikeln beobachtet werden. Zusätzlich begünstigt wurde die Interaktion mit dem negativ geladenen A β -Peptid durch die neue Modifikation der Liganden mit den kationischen Lysinpeptiden.

3.3 Bifunktionale Nanopartikelkonjugate

Goldnanopartikeloberflächen eignen sich hervorragend zur Immobilisierung von unterschiedlichsten Wirkstoffen. Um eine höhere lokale Wirksamkeit zu erreichen, kann die Ligandendichte auf der Oberfläche variiert werden. Ein besonderer Vorteil wäre es, wenn ein Ligandengemisch auf die Nanopartikel gebracht werden und somit zwei unterschiedliche Substanzen synergistisch wirken könnten. Hierzu wurden die in den vorherigen Kapiteln untersuchten Liganden genutzt, um bifunktionale Goldnanokonjugate herzustellen. Um zu vergleichen, ob zwei unterschiedliche Wirkstoffe auf einem Nanopartikel besser wirken können als z.B. eine Hybridverbindung aus diesen beiden Stoffen, wurde zuerst die Hybridverbindung aus einem D3-Peptid und einer Aminopyrazoltrimereinheit hergestellt.

3.3.1 Synthese einer Hybridverbindung aus A β -Selektor und β -Faltblattbrecher

Da in vorherigen Arbeiten die Hybridverbindung, bestehend aus Trimer und D3-Peptid, sehr gute inhibierende Eigenschaften aufweisen konnte, sollte ein Derivat synthetisiert werden, welches auf Goldnanopartikel immobilisiert werden kann. Hierzu wurde erneut an der festen Phase das D3_5+-Peptid mit einem endständigen Thiol (**28**) hergestellt und in einem letzten Schritt mit der Trimersäure (**44**) verknüpft.

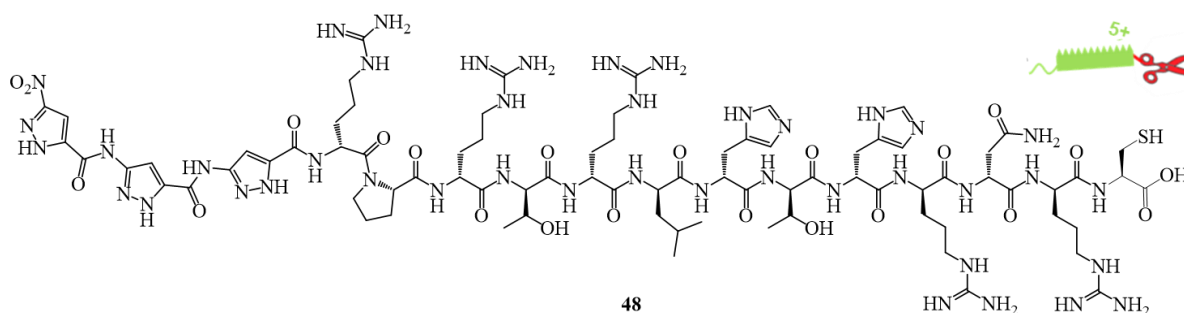


Abb. 135: Struktur der Hybridverbindung Hybrid_5+ (**48**).

Nach Abspaltung vom Harz und entsprechender Entfernung der Schutzgruppen, konnte die Hybridverbindung (**48**) mit hoher Reinheit erhalten werden. Allerdings stellte sich bei dieser Verbindung eine schlechte Wasserlöslichkeit heraus. In **Tab. 12** sind die Eigenschaften der neuen Verbindung **48** aufgeführt.

Tab. 12: Eigenschaften der Hybridverbindung 48.

Ligand	Aminosäuresequenz	Summenformel	Molare Masse [g/mol]	Nettoladung (pH = 7)
Hybrid_5+ (48)	Trimer- RPRTLHTHRNC	$C_{80}H_{126}N_{42}O_{22}S$	2060	+5

Die Nettoladung der Hybridverbindung lag bei +5, da durch die Arginine des D3_5+-Peptids eine allgemein positive Ladung entstand. Weiter wurden lasergenerierte Goldnanopartikel mit der neuen Hybridverbindung vereinigt und anschließend die Konjugatstabilität ($c(\text{Ligand}) = 10 \mu\text{M}$) untersucht. Zum Vergleich sind die Zetapotentialwerte der Einzelverbindungen bei gleicher Konzentration abgebildet (**Abb. 136**).

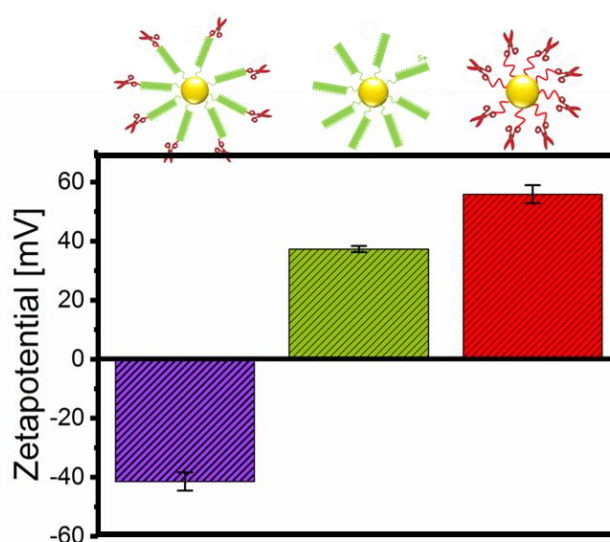


Abb. 136: Zetapotentialmessungen von Au/Hybrid_5+ (48), Au/D3_5+ (28) und Au/Trim_5+ (46), dargestellt als Balkendiagramm ($c(\text{Ligand}) = 10 \mu\text{M}$).

Obwohl die Hybridverbindung aus den beiden Einzelkomponenten D3_5+ und Trimersäure bestand, zeigte sie abweichende Eigenschaften: Das Zetapotential des Konjugats lag bei einer Ligandenkonzentration von $10 \mu\text{M}$ noch weit im stabilen negativen Bereich. Die Einzelkonjugate hingegen wiesen bei dieser Ligandenkonzentration stabile positive Werte auf. Scheinbar immobilisierte durch die mäßige Wasserlöslichkeit der Hybridverbindung nur eine sehr geringe Anzahl an Liganden auf der Nanopartikeloberfläche, so dass die Gesamtladung der Konjugate bei hohen Konzentrationen weiterhin durch die negative Partikeloberfläche bestimmt wurde.

Für einen konkreten Vergleich zwischen der Hybridverbindung (**48**) und bifunktionalen Nanopartikeln wurde zusätzlich neben den Einzelverbindungen noch ein weiteres Konjugat hergestellt. Das vierte Konjugat bestand aus einem Gemisch aus D3_5+ (**28**) und Trim_5+ (**46**) in einem 1:1-Verhältnis, welches auf Goldnanopartikel immobilisiert wurde. Als D3-Derivat wurde das coumaringelabelte D3-Peptid in den UV/Vis-Untersuchungen eingesetzt.

Die Ergebnisse der UV/Vis-Messungen sind in **Abb. 137** dargestellt. Es werden die kolloidalen Eigenschaften in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration gezeigt.

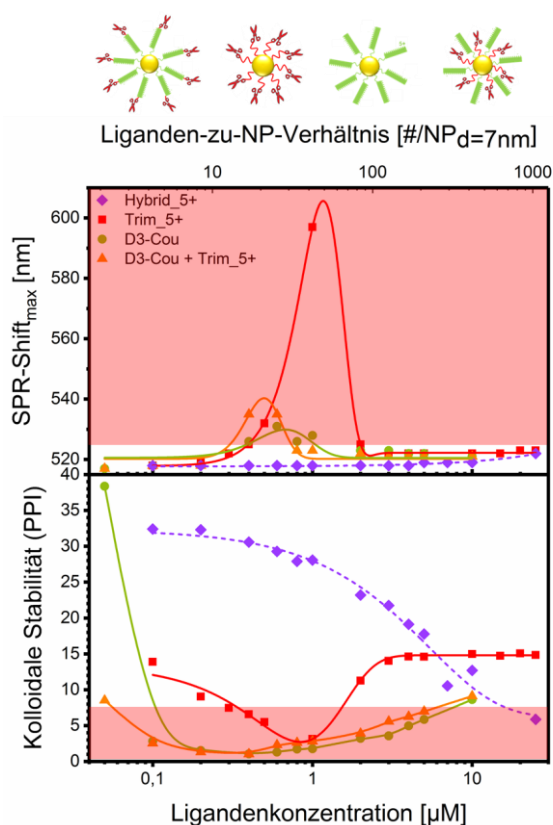


Abb. 137: Verschiebung des SPR-Peaks (oben) und Kolloidale Stabilität (unten) in Abhängigkeit vom Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis von Au/Hybrid_5+, Au/D3_5+, Au/Trim_5+ und Au/D3_5+/Trim_5+-Konjugaten. Der rot markierter Bereich kennzeichnet das Vorhandensein von instabilen Konjugaten.^[178]

Sowohl bei der kolloidalen Stabilität (Bestimmung des PPI) als auch bei der Verschiebung des SPR-Peaks zeigten die bifunktionalen Konjugate ähnlichere Eigenschaften zu den Au/D3-Cou-Konjugaten als zu den Au/Trimer-Konjugaten. Das jeweilige SPR-Maximum der Konjugate trat bei bifunktionalen Konjugaten bei einem früheren Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis auf als bei monofunktionalen Konjugaten.

Die Hybridverbindung zeigte in beiden Spektren ganz neue Eigenschaften und ähnelte keinem der Einzelkonjugate. Schon in früheren Arbeiten konnten neue Eigenschaften einer strukturell sehr ähnlichen Hybridverbindung (**19**) gezeigt werden, welche die Einzelverbindungen nicht aufwiesen.^[86]

Weiter wurden unterschiedliche Ansätze zur Herstellung von bifunktionalen Goldnanopartikeln untersucht, indem das Verhältnis der Liganden (1:1 oder 1:10) und die Reihenfolge der Ligandenzugabe (sequentiell oder direkt als Gemisch) variiert wurde. Die sequentielle Zugabe hätte den Vorteil, dass bei einem 1:10 Verhältnis beide Liganden immobilisiert werden könnten, da die Bindung des ersten Liganden nahezu vollständig erfolgen würde. Ein Nachteil könnte hier allerdings sein, dass der erste Ligand im Überschuss zugegeben wird, so dass eine 1:1 Stöchiometrie schwer umsetzbar wäre.

Bei einem 1:1 Verhältnis könnte der erste Ligand jedoch den zweiten Liganden behindern, wodurch keine vollständige Immobilisierung auf der Oberfläche stattfinden würde.

Generell sollten bei bifunktionalen Konjugaten beide Liganden ähnliche Ladungen besitzen, da sonst Konkurrenzreaktionen der Liganden untereinander um den Bindungsplatz auf der Oberfläche auftreten könnten.

Die Zugabe von Gold zu einer vorgelegten 1:1 Ligandenmischung zeigte in UV/Vis-Spektren die Bildung stabiler Konjugate. Die Verschiebung des SPR-Peaks lag nur bei 4 nm im Vergleich zu stabilen reinen Goldnanopartikeln (**Abb. 138**).

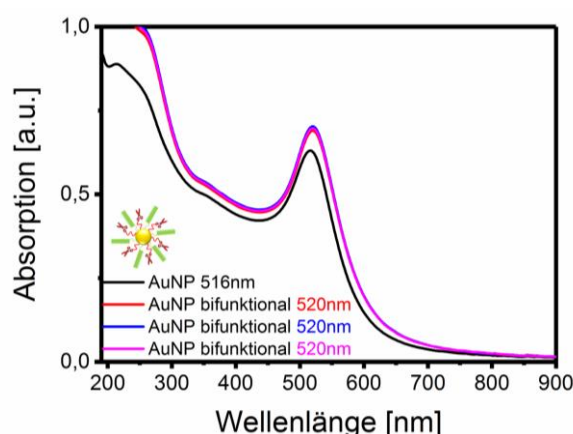


Abb. 138: UV/Vis-Spektren von reinen Goldnanopartikeln und bifunktionalen Goldkonjugaten (1:1 D3_5+/Trim_5+).

In **Abb. 139** sind sowohl die UV/Vis-Spektren als auch die Ergebnisse der Zetapotentialmessungen von einem 1:10-Ligandenverhältnis auf Goldnanopartikeln dargestellt. Hierbei sollte herausgefunden werden, ob eine sequentielle Zugabe der Liganden zu den Nanopartikeln die Bindung des zweiten Liganden behindern könnte. Zum Vergleich wurde der erste immobilisierte Ligand ebenfalls als monofunktionales Konjugat mit derselben niedrigen Konzentration ($c(\text{Ligand 1}) = 0.3 \mu\text{M}$) gemessen.

Bei Zugabe von nur $0.3 \mu\text{M}$ des ersten Liganden änderte sich der SPR-Peak direkt (**Abb. 139 a** grün, **c** rot). Das Zetapotential der anionischen Konjugate hingegen wich nur sehr wenig vom Wert der reinen Goldnanopartikeln ab. Somit blieb der Wert bei sehr geringen Ligandenkonzentrationen im negativen Bereich (**Abb. 139 b** grün, **d** rot).

Bei anschließender Zugabe von $3 \mu\text{M}$ des zweiten Liganden wechselte das Zetapotential in den positiven Bereich, da nun die positive Ladung der Liganden überwog (**Abb. 139 b** und **d** orange schraffiert). Die späte Zetapotentialänderung (erst bei Zugabe des zweiten Liganden) zeigte deutlich, dass eine Immobilisation des zweiten Liganden erfolgen konnte.

Bei zeitgleicher Zugabe der Liganden ($0.3 \mu\text{M}$ Ligand 1 und $3 \mu\text{M}$ Ligand 2 als Gemisch) wechselte der Zetapotentialwert allerdings direkt in den positiven Bereich (**Abb. 139 b** und **d** orange). Diese Beobachtungen konnten, unabhängig von der Wahl des ersten Liganden, bei beiden bifunktionalen Varianten (D3_5+12/Trim_5+125 bzw. Trim_5+12/D3_5+125) gezeigt werden.

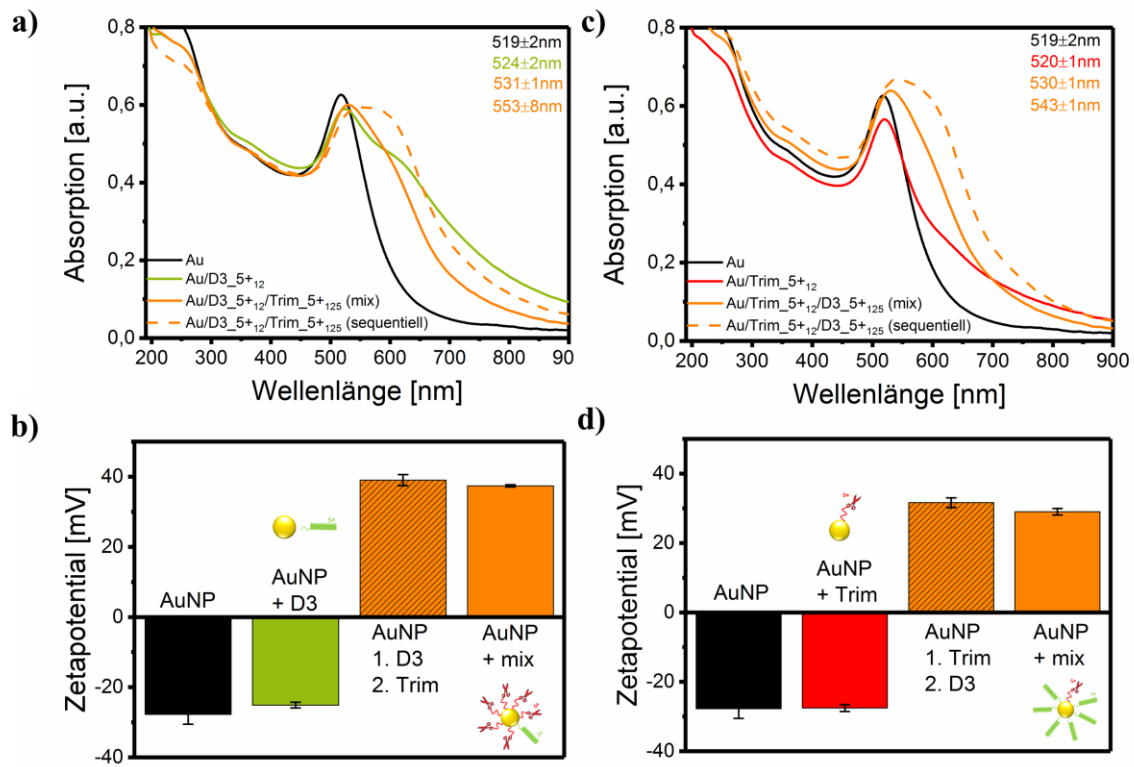


Abb. 139: UV/Vis-Spektren (oben) und Zetapotentialmessungen (unten) von bifunktionalen Liganden im 1:10-Verhältnis. D3_5+ und Trim_5+ wurden sequentiell oder als Mischung zu AuNPs gegeben. Es werden Konjugate mit 0.3 μM D3_5+ und 3 μM Trim_5+ (links) und Konjugate mit 0.3 μM Trim_5+ und 3 μM D3_5+ (rechts) gezeigt.^[178]

Die Verwendung von bifunktionalen Konjugaten im 1:1-Verhältnis wurde durch die höhere Stabilität der Konjugate in späteren Funktionalitätsuntersuchungen favorisiert.

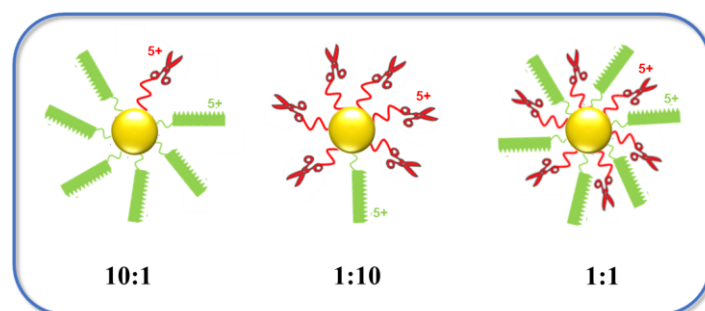


Abb. 140: Darstellung von bifunktionalen Goldkonjugaten als 1:10- und 1:1-Varianten.

Im Weiteren wurde die Ligandendichte bei den bifunktionalen Konjugate bestimmt. Hierbei sollte geprüft werden, wie dicht gepackt die Ligandenoberfläche bei unterschiedlicher Ligandenzugabe war. Zuerst wurden die Konjugate mit einem 1:10-Verhältnis hergestellt und die Konzentration an ungebundenen Liganden im Überstand analysiert. Da die vollständige Bindung des ersten Liganden im Unterschuss angenommen werden kann, wurde der Fokus auf die Menge des zweiten Liganden im Überstand gelegt. Interessant war hierbei die Konjugationseffizienz des zweiten Liganden: Trim_5+ zeigte hierbei eine höhere Effizienz als D3_5+ (**Abb. 141b**).

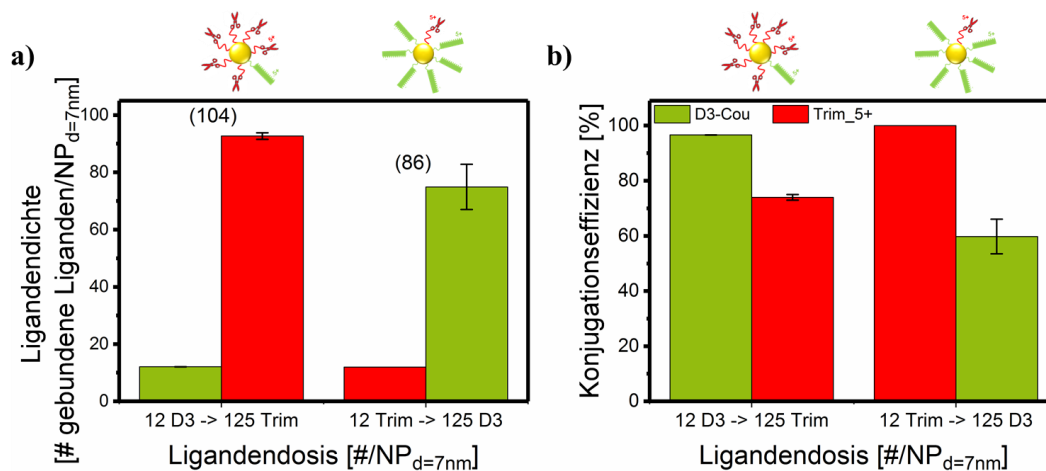


Abb. 141: Ligandendichte (a) und Ligandeneffizienz (b) von bifunktionalen 1:10-Konjugaten (D3_5+ und Trim_5+).^[178]

Die Ligandendichte ähnelte dem Ligandenbelegungsgrad der monofunktionalen Konjugate. Bei dem monofunktionale Trimerkonjugat konnten 98 Liganden von 125 Liganden pro Nanopartikel auf der Oberfläche binden (Kapitel 3.2.2). Wurde ein bifunktionales Konjugat hergestellt mit wenig D3_5+ Liganden und einer hohen Konzentration an Trim_5+-Liganden (D3₁₂/Trim₁₂₅), so zeigte sich, dass bei dem zweiten Liganden im Überschuss noch etwa 104 Liganden auf die Partikeloberfläche binden konnten. Andersherum hatte das Konjugat aus Trim₁₂ und D3₁₂₅ insgesamt eine Dichte von ca. 86 Liganden pro Nanopartikel, das monofunktionale Konjugat Cou-D3₁₂₅ 89 Liganden pro Nanopartikel.^[178] Die Ergebnisse zur Bestimmung der Ligandendichte und Konjugationseffizienz bei bifunktionalen Konjugaten werden in **Abb. 141a** und **Tab. 13** gezeigt.

Tab. 13: Anzahl der gebundenen Liganden bei monofunktionalen Konjugaten Au/D3-Cou, Au/Trim_5+ und bei bifunktionalen Konjugaten Au/D3_5+/Trim_5+ in unterschiedlichen Verhältnissen.^[178]

Liganden	Gebundene Liganden [# / NP]
D3 ₁₂₅ (Cou-D3-Cys)	89
Trim ₁₂ /D3 ₁₂₅ (1:10)	86
Trim ₁₂₅ (Trim_5+)	98
D3 ₁₂ /Trim ₁₂₅ (1:10)	104
D3 ₁₂₅ /Trim ₁₂₅ (1:1)	109

Ebenfalls wurde die Ligandendichte von bifunktionalen Konjugaten mit einem 1:1-Ligandenverhältnis untersucht. Die Liganden wurden als Gemisch auf Partikeloberfläche gegeben. Bei den 1:1-Konjugaten wurden zusätzlich unterschiedliche Ligandenkonzentrationen getestet (Abb. 142).

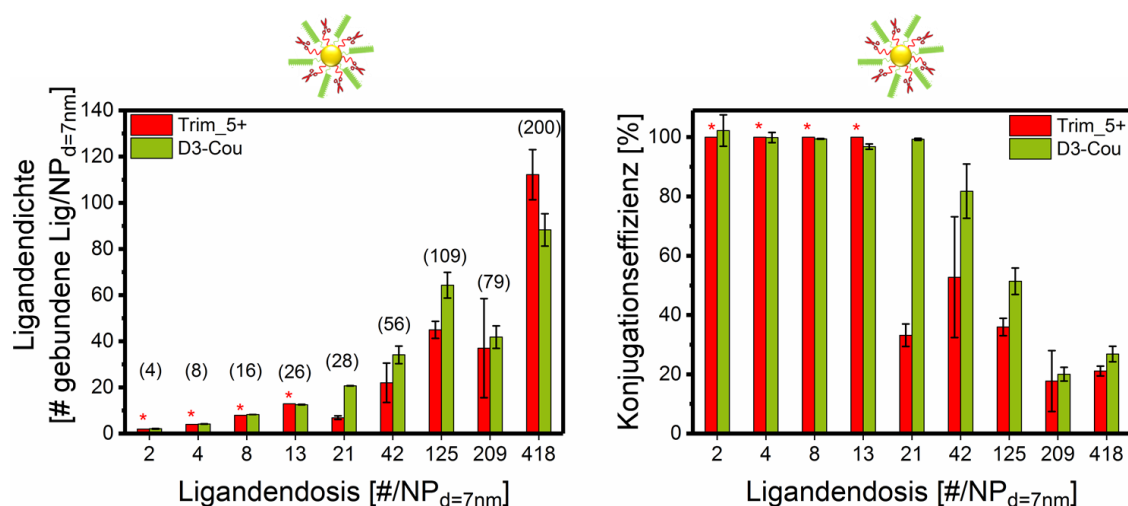


Abb. 142: Dichte (links) und Konjugationseffizienz (rechts) der Liganden bei bifunktionalen 1:1-Konjugaten.^[178]

Es zeigte sich, dass die Nanopartikeloberfläche nicht exakt im 1:1-Verhältnis von den Liganden bedeckt wurde. Allgemein konnte der D3-Ligand besser auf die Nanopartikeloberfläche konjugieren als der Trimerligand. Bei sehr hohen und sehr niedrigen Konzentrationen konnte jedoch eine nahezu gleichmäßige Aufteilung der Liganden auf der Oberfläche erzielt werden. Die Quantifizierung der Aminopyrazolliganden war allerdings nicht exakt, da bei Konzentrationen unter 21 Aminopyrazolliganden/NP die Nachweisgrenze des UV/Vis-Spektrometers erreicht wurde.

Folglich wurde bei bifunktionalen Konjugaten ein 1:1-Verhältnis für die Funktionalitätstests gewählt, um einen besseren Vergleich zu rein monofunktionalen Nanopartikeln ziehen zu können. Bei einer 1:10-Stöchiometrie könnte die Wirkung des höher eingesetzten Liganden die des zweiten Liganden überdecken, so dass ein kooperativer Effekt ausgeschlossen wäre.

Die hergestellte Hybridverbindung zeigte neue spezifische Eigenschaften, die die Einzelverbindungen nicht besaßen. Diese Verbindung konnte daher als Referenzverbindung zu bifunktionalen Konjugaten nicht verwendet werden.

3.3.2 Wirkung der bifunktionalen Nanopartikel auf A β (1-42)

Die Affinität der Liganden (1:1-Gemisch aus D3_5+ und Trim_5+) und den entsprechenden bifunktionalen Konjugaten gegenüber A β wurde durch Quenchingexperimente bestimmt. Erneut wurden die beiden Einzelliganden D3_5+ und Trim_5+ als Vergleich in der Auswertung herangezogen. Bei dem freien D3-Liganden lag die Affinität gegenüber A β bei 4.6 nM, durch Immobilisierung auf Goldnanopartikel konnte diese um das 2.2-fache gesteigert werden (2.1 nM). Die freien Aminopyrazolliganden wiesen eine niedrigere Affinität (7.1 nM) zu A β auf als die D3-Liganden. Jedoch wurde auch hier die Bindungsstärke um den Faktor 1.8 erhöht, sobald die Trimerliganden immobilisiert wurden (4 nM). Bei bifunktionalen 1:1-Konjugaten lag der K_D -Wert des Konjugats mit 2.3 nM nahe dem des Au/D3-Konjugats (**Abb. 143**).

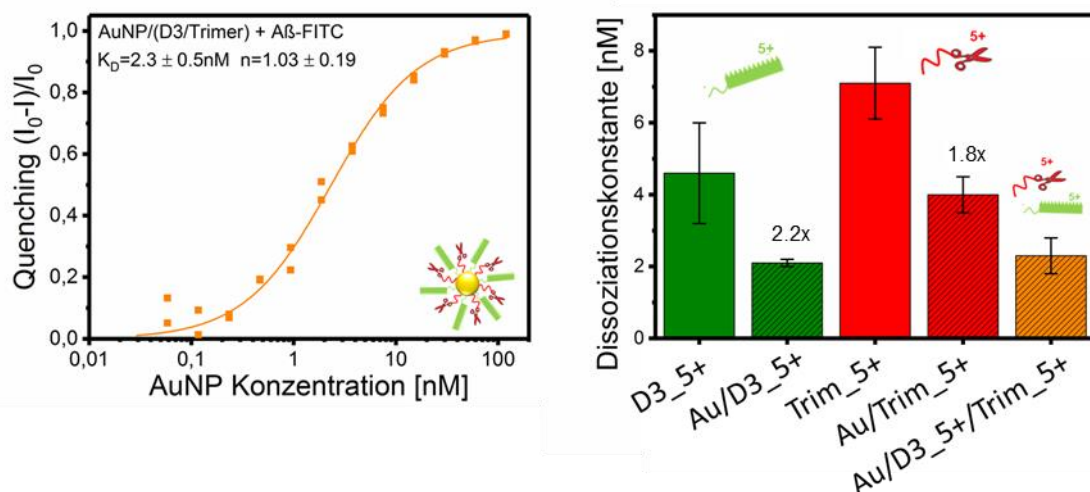


Abb. 143: Bestimmung der Dissoziationskonstante von bifunktionalen 1:1 Goldkonjugaten mit A β -FITC durch Fluoreszenzquenchinguntersuchungen ($c(\text{A}\beta\text{-FITC}) = 0.125 \mu\text{M}$) (links). Zum Vergleich die Ergebnisse der Einzelsubstanzen D3_5+ (grün) und Trim_5+ (rot) und ihrer monofunktionalisierten Konjugate gegenüber dem bifunktionalen 1:1-Konjugat (orange) (rechts).

Erneut zeigten die bifunktionalen Konjugate in ihrer Affinität gegenüber A β größere Ähnlichkeiten zu den D3-Konjugaten. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass die D3-Einheit speziell als eine Erkennungseinheit für das A β -Peptid entwickelt wurde, zum anderen zeigte der D3-Ligand allgemein eine bessere Konjugationseffizienz, wodurch bei bifunktionalen Konjugaten trotz 1:1-Stöchiometrie mehr D3-Liganden als Trimerliganden auf den Partikeloberflächen immobilisierten.

3.3.2.1 ThT-Messungen

Die Wirkung von bifunktionalen Konjugaten auf die A β -Fibrillenbildung wurde ebenfalls durch ThT-Experimente untersucht. Es wurden sowohl die Mischung aus freien D3_5+- und Trim_5+-Liganden im 1:1-Verhältnis, als auch die entsprechenden Konjugate getestet. Die Ligandenkonzentration betrug für jeden Liganden 30 μ M, A β wurde in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt. In **Abb. 144** sind die Ergebnisse der Experimente dargestellt. Zum Vergleich sind zusätzlich die Messwerte aus vorherigen Untersuchungen (Kapitel 3.1.4.1 und Kapitel 3.2.3.1) für die Einzelliganden D3_5+ und Trim_5+ abgebildet. Für die Einzelliganden wurden jeweils 60 μ M Ligand eingesetzt. Die Werte sind in Prozent, bezogen auf die A β -Kontrolle (= 100 %) angegeben.

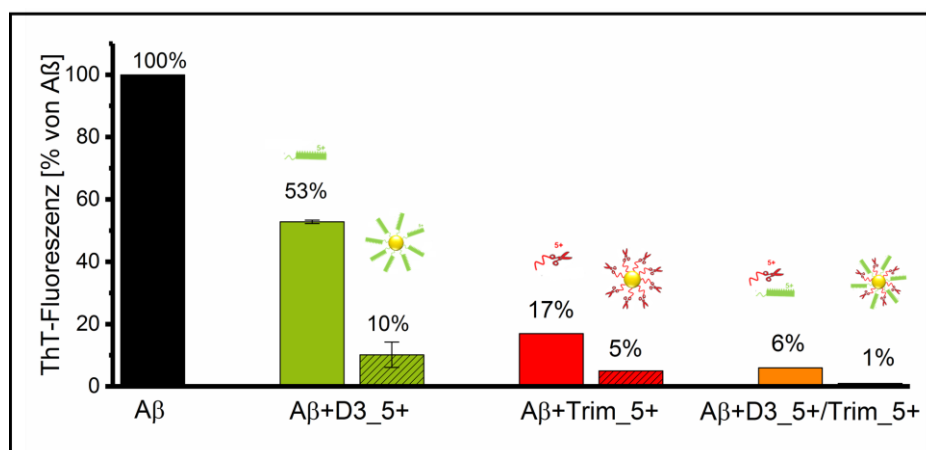


Abb. 144: Ergebnisse der ThT-Untersuchungen von 10 μ M A β (1-42) (schwarz), sowie A β mit unterschiedlichen Einzelliganden (D3_5+ bzw. Au/D3_5+ (grün) und Trim_5+ bzw. Au/Trim_5+ (rot)) inkubiert. Ebenfalls die Ergebnisse von A β mit einer 1:1-Mischung aus D3_5+/Trim_5+ bzw. Au/D3_5+/Trim_5+ (orange) Inkubation ($c(\text{AuNP}) = 300 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{Ligand}_{\text{monofunkt.}}) = 60 \mu\text{M}$, $c(\text{Ligand}_{\text{bifunkt.}}) = \text{jeweils } 30 \mu\text{M}$, Inkubationszeit: 5 Tage bei 37 °C und 650 rpm).

Die freie 1:1-Mischung aus beiden Liganden (**28** und **46**) reduzierte das Fluoreszenzsignal außerordentlich stark auf 6 %. Die immobilisierte Mischung inhibierte die Fibrillenbildung nahezu vollständig. Im Vergleich zu den Einzelsubstanzen zeigte die Mischung eine immense Wirksteigerung. Unter der Berücksichtigung der verwendeten Ligandenkonzentrationen (monofunktional 60 μM , bifunktional jeweils nur 30 μM) zeigte das Gemisch eine gesteigerte und demnach auch eine synergistische Wirkung beider Liganden.

Die Hybridverbindung **48** wurde ebenfalls auf ihre aggregationsinhibierenden Eigenschaften getestet. Es wurden bei der Auswertung erneut die Ergebnisse der Einzelkomponenten D3_5+ und Trim_5+ als Vergleich herangezogen (**Abb. 145**).

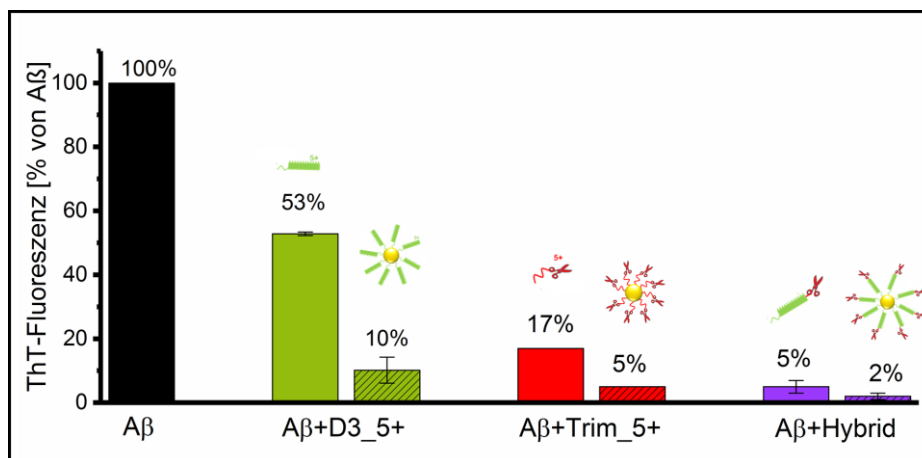


Abb. 145: Ergebnisse der ThT-Untersuchungen von 10 μM A β (1-42), sowie A β mit den Einzelliganden (D3_5+ und Au/D3_5+ (grün), Trim_5+ und Au/Trim_5+ (rot)) inkubiert. Zusätzlich die Ergebnisse der Inkubation von A β mit Hybrid_5+, bzw. Au/Hybrid_5+(lila) ($c(\text{AuNP}) = 300 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{D3}_5+) = 60 \mu\text{M}$, $c(\text{Trim}_5+) = 60 \mu\text{M}$, $c(\text{Hybrid}) = 30 \mu\text{M}$, Inkubationszeit: 5 Tage bei 37 °C und 650 rpm).

Die Hybridverbindung zeigte eine sehr starke Reduzierung der A β -Aggregation. Schon der freie Ligand konnte das Fluoreszenzsignal auf 5 % verringern, die Einzelkomponenten konnten solch eine Wirkung auch bei der doppelten Ligandenkonzentration nicht erreichen. Eine Immobilisierung auf Goldnanopartikel steigerte die Wirkung der Hybridverbindung weiter, der messbare Fibrillenanteil in der Lösung war vernachlässigbar gering.

Die Hybridverbindung zeigte im Vergleich zu einer bifunktionalen Ligandenmischung eine gleichwertig starke Wirkung: Sowohl die freien Liganden, als auch die Konjugate konnten den Fibrillenanteil in den Probenlösungen auf unter 6 % reduzieren.

3.3.2.2 CD-Messungen

Die bifunktionale 1:1-Mischung und das entsprechende Konjugat wurden ebenfalls mittels CD-Spektroskopie analysiert. Hier sollte die Wirkung der Substanzen auf die Sekundärstruktur von A β -Peptiden untersucht werden. Ebenfalls wurde die Hybridverbindung **48** in sehr geringer Konzentration (0.1 μ M) untersucht. Für die Auswertung wurden die Ligandenspektren (bzw. Konjugatspektren) von den entsprechenden A β -Ligandenspektren (A β -Konjugatspektren) subtrahiert. Ebenfalls wurde in jedes Spektrum der charakteristische Bandenverlauf der A β -Referenzprobe (A β (1-42) ohne Ligandenzusatz nach 24 h Aggregationszeit dargestellt. Es wurden 10 μ M A β mit je 5 μ M Ligand, bzw. 0.1 μ M Hybridligand eingesetzt.

In den Experimenten übte die Mischung aus Trim_5+ und D3_5+ eine destabilisierende Wirkung auf die Sekundärstruktur des A β -Peptids aus (**Abb. 146**). Nach einer Stunde änderte sich der Einfluss der Liganden jedoch nicht mehr, die maximale Wirkung der Liganden war erreicht. Die Immobilisierung des Gemischs auf Goldnanopartikel verstärkte die Wirkung der Liganden, nach einer Stunde war die typische Bande vollständig aufgelöst. Nach kurzer Inkubationszeit (1 h) lagen in der Probe demzufolge keine messbaren β -Faltblattstrukturen mehr vor.

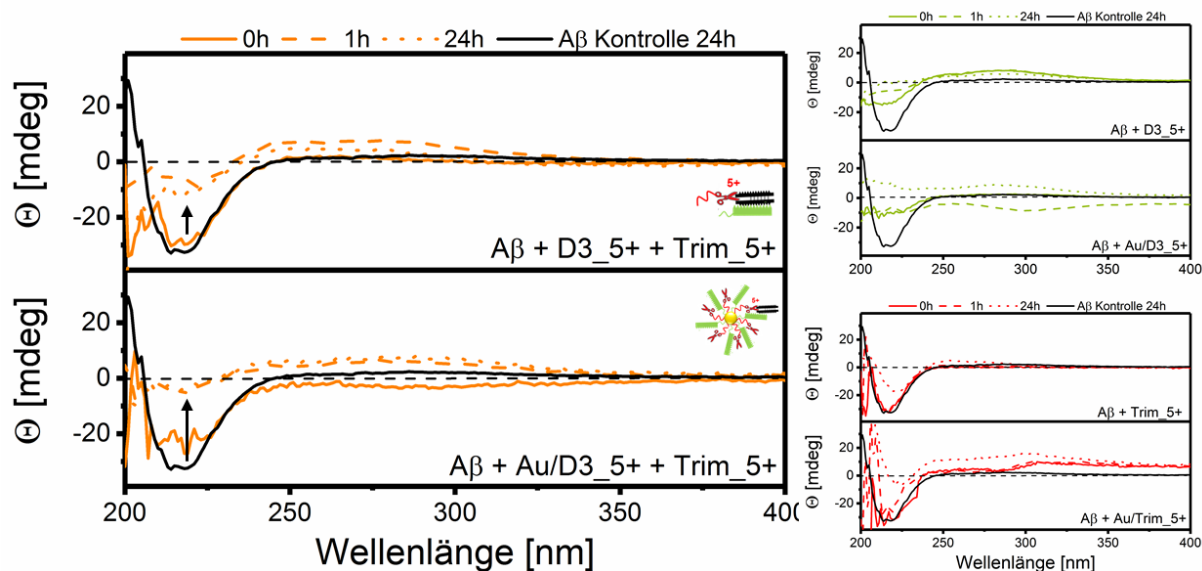


Abb. 146: CD-Spektren über 24 h von A β (schwarz) und A β mit einer 1:1-Mischung aus D3_5+/Trim_5+ (links oben) bzw. den entsprechenden Konjugaten (links unten) inkubiert ($c(\text{A}\beta) = 10 \mu\text{M}$, $c(\text{je Ligand}) = 5 \mu\text{M}$, $c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$). Zum Vergleich die CD-Spektren der Einzelverbindungen D3_5+ (grün) und Trim_5+ (rot) und deren Konjugate (rechts).

Die Mischung beider Liganden zeigte im Vergleich zu den Einzelsubstanzen unterschiedliche Ergebnisse: Sowohl bei den freien Liganden, als auch auf Goldnanopartikel immobilisiert, konnte das Gemisch nach direkter Zugabe keine bis eine geringe Wirkung auf die Sekundärstruktur zeigen. Dieser Verlauf konnte auch bei der Einzelkomponente Trim_5+ beobachtet werden. Nach einer Stunde zeigte das Gemisch allerdings stärkere Effekte auf die Sekundärstruktur als Trim_5+. Hier ähnelten die Ergebnisse denen der Einzelkomponente D3_5+: Die Bandenintensität wurde sowohl bei dem freien Gemisch als auch bei D3_5+ jeweils um die Hälfte verringert, bei den entsprechenden Konjugaten jeweils vollständig aufgelöst.

Die Hybridverbindung **48** wurde ebenfalls frei und auf Goldnanopartikel immobilisiert mittels CD-Spektroskopie analysiert. Es wurde hierbei eine sehr geringe Ligandenkonzentration von 0.1 μM bei einer A β -Konzentration von 10 μM eingesetzt. **Abb. 147** zeigt die Auswertungen der CD-Experimente.

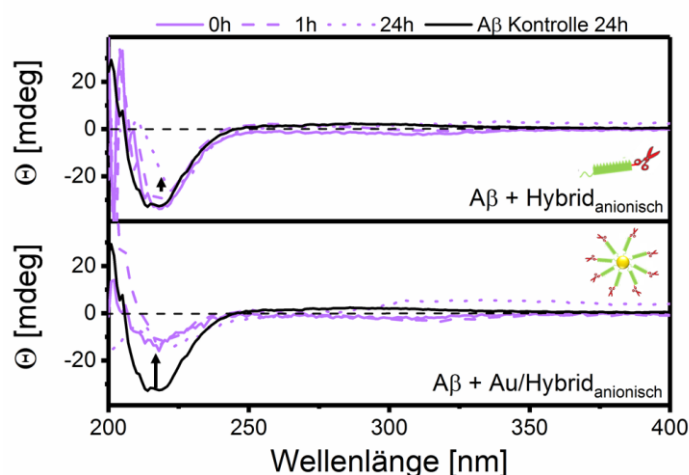


Abb. 147: CD-Spektren über 24 h von A β als Referenz (schwarz) und mit Hybrid_5+ (oben) bzw. Au/Hybrid_5+ (unten) inkubiert ($c(\text{A}\beta) = 10 \mu\text{M}$; $c(\text{Ligand}) = 0.1 \mu\text{M}$, $c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$).

Der freie Hybridligand übte bei sehr niedrigen Konzentrationen keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur des A β -Peptids aus. Wurde der Ligand allerdings auf Nanopartikel immobilisiert, zeigte sich auch hier nach direkter Konjugatzugabe eine nahezu vollständige Auflösung der charakteristischen Bande für β -Faltblattstrukturen. Reine Nanopartikel hatten bereits in vorherigen Experimenten keine Wirkung auf die Sekundärstrukturen gezeigt (Kapitel 3.1.4.2), so dass die hier erzeugten Ergebnisse der anionischen Konjugate den geringen Mengen an Liganden auf der Nanopartikeloberfläche zugesprochen werden können.

3.3.2.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Ebenfalls wurden die bifunktionalen Nanopartikeln mittels AFM-Messungen untersucht (**Abb. 148**). Hierfür wurde A β zuvor für 24 h bei einem pH-Wert von 2 vorinkubiert. Anschließend wurden die Proben jeweils entweder mit reinen Goldnanopartikeln ($c(\text{AuNP}) = 125 \mu\text{g/mL}$), mit einer 1:1-Mischung der freien Liganden ($c(\text{je Ligand}) = 12.5 \mu\text{M}$) oder den bifunktionalen Konjugaten versetzt und weiter inkubiert. Als Kontrolle diente eine Referenzprobe ohne weitere Zugabe von Testsubstanzen ($c(\text{A}\beta) = 50 \mu\text{M}$). Die Inkubation mit reinen Goldnanopartikeln zeigte im Vergleich zu der A β Referenzprobe ebenfalls keine Veränderung in der Fibrillenmenge: Beide AFM-Bilder zeigten hier eine Oberflächenbedeckung von 19 %. Wurde A β jedoch mit einer Mischung aus D3_5+ und Trim_5+ inkubiert, reduzierte sich die Menge an Fibrillen auf etwa die Hälfte (10 % Oberflächenbedeckung). Das Ligandengemisch auf Nanopartikel immobilisiert, erwirkte eine noch effektivere Fibrillenreduktion (6 % Oberflächenbedeckung) (**Abb. 149**).

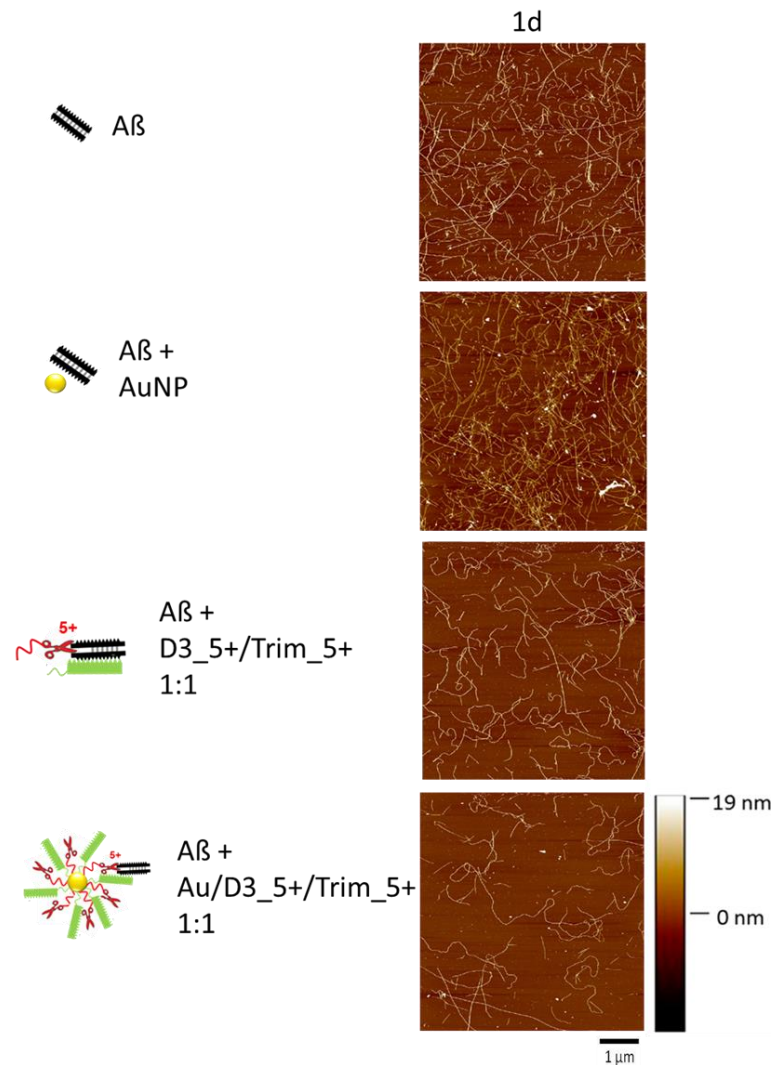


Abb. 148: AFM-Bilder von Aβ-Fibrillen nach einem Tag Inkubation. Aβ wurde mit reinen AuNPs, einer 1:1 Mischung aus D3_5+/Trim_5+ und dem entsprechenden bifunktionalen Konjugat (je 209 Lig/NP) inkubiert ($c(\text{AuNP}) = 125 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{je Ligand}) = 12.5 \mu\text{M}$, $c(\text{A}\beta) = 50 \mu\text{M}$). Es erfolgte eine 1:20 Verdünnung aller Proben vor der Aufnahme.^[178]

Im Vergleich zu den monofunktionalisierten Konjugaten, D3_5+ (frei 15 %, immobilisiert 25 % bei 418 Lig/NP) und Trim_5+ (frei 13 %, immobilisiert 13 % bei 418 Lig/NP) konnte die Mischung der Liganden nach 24 h Inkubationszeit insgesamt eine stärkere Wirkung zeigen. Besonders die bifunktionalen Nanopartikel reduzierten die Fibrillenmenge signifikant.

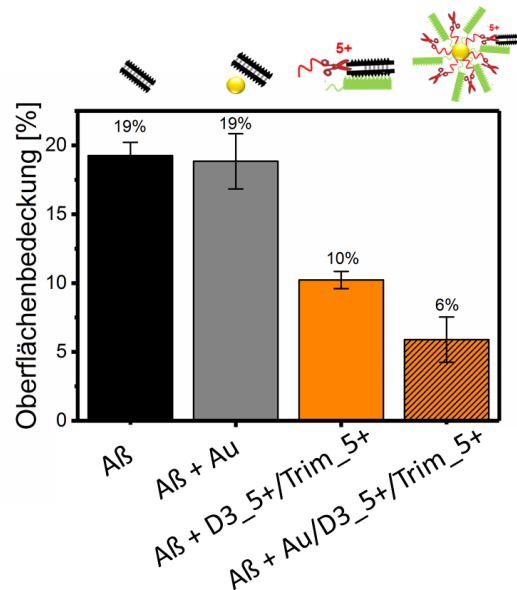


Abb. 149: Prozentuale Auswertung der Oberflächenbedeckung von Aβ-Fibrillen nach 24 h. Aβ alleine und Aβ mit reinen AuNPs, einer 1:1-Mischung aus D3_5+/Trim_5+ oder dem entsprechenden Konjugat inkubiert.^[178]

Da hier ein 1:1-Verhältnis der Liganden eingesetzt wurde, halbierte sich auch die verwendete Ligandenkonzentration. So konnten bei den bifunktionalen Partikeln 209 D3_5+-Liganden und 209 Trim_5+-Liganden auf der Oberfläche zusammen eine stärkere Wirkung erzielen als jeweils 418 Einzelliganden bei monofunktionalen Partikeln. Dies deutet erneut auf eine synergistische Wirkung der beiden Liganden auf den Nanopartikeln hin.

3.3.2.4 Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) und enzymgekoppelter Immunsorptions-test (ELISA)

Mit der Methodenkombination DGZ/ELISA wurde der Einfluss der 1:1-Mischung aus den freien Liganden D3_5+ und Trim_5+ und der Einfluss des entsprechenden bifunktionalen Konjugats auf die Aβ-Fibrillenaggregation untersucht. Hierzu wurde Aβ für 24 h bei 37 °C mit den jeweiligen Proben inkubiert, anschließend mit Hilfe der DGZ nach der Größe und Form der Aβ-Spezies aufgetrennt und die Aβ-Menge in den einzelnen Fraktionen mittels ELISA detektiert. In **Abb. 150 a** ist die Verteilung der unterschiedlichen Aβ-Spezies in den einzelnen Fraktionen dargestellt.

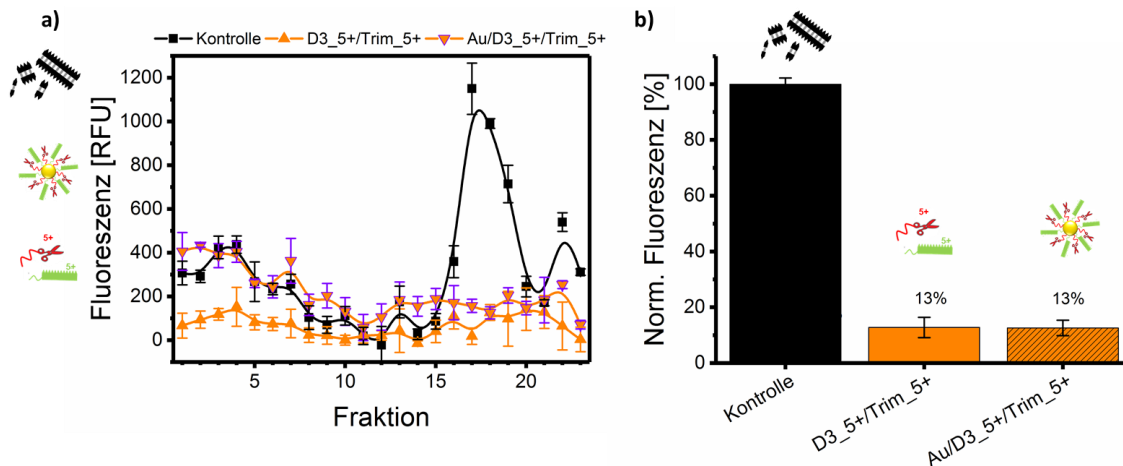


Abb. 150: Quantifizierung der A β -Spezies mittels DGZ/ELISA. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde die Wirkung der Mischung aus D3_5+ und Trim_5+ im Verhältnis 1:1 und der Mischung auf Goldnanopartikel immobilisiert untersucht (a) ($c(\text{AuNP}) = 200 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{je Ligand}) = 20 \mu\text{M}$, $c(\text{A}\beta) = 40 \mu\text{M}$). Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Gehalt an A β in der 18.DGZ-Fraktion (bezogen auf die Kontrollprobe =100 %) (b).

Sowohl die freie Ligandenmischung, als auch das bifunktionale Konjugat zeigten eine starke aggregationsinhibierende Wirkung. In den vorderen Fraktionen jeder Probe (A β -Referenz, A β mit der freien Mischung und A β mit bifunktionalen Konjugaten), in denen sich Monomere bis kleinere A β -Oligomere ansammeln konnten, waren durch die lange Inkubationszeit nur noch sehr wenig A β -Strukturen zu detektieren. In den Fraktionen 15-20 der Referenzprobe war der Anteil an Protofibrillen und reifen A β -Fibrillen jedoch sehr hoch. Eine Inkubation mit den Testsubstanzen konnte den Anteil dieser größeren A β -Spezies in den genannten Fraktionen jedoch stark reduzieren. **Abb. 150 b** zeigt den prozentualen Anteil an A β in der 18. Fraktion. Im Vergleich zur Kontrollprobe konnten beide Testsubstanzen, sowohl das 1:1-Gemisch aus freien D3_5+ und Trim_5+-Liganden als auch das Konjugat Au/D3_5+/Trim_5+, die A β -Menge auf 13 % verringern. Die Einzelsubstanz D3_5+ und das Au/D3_5+-Konjugat zeigten ähnliche Eigenschaften (frei 13 %, gebunden 10 %). Der Ligand Trim_5+ hingegen konnte bei diesen Untersuchungen als Einzelverbindung keine so starke Wirkung aufweisen (frei 95 %, gebunden 44 %). Demnach dominierte in dieser Methode die Wirkung des D3-Liganden sowohl bei den freien Gemischen als auch bei den bifunktionalen Konjugaten.

3.3.2.5 Zellkulturassay und Mikroskopie der Zellen

In Zellkulturexperimenten sollte der Einfluss der 1:1-Ligandenmischung und das entsprechende Konjugat auf 10-15 kDa große A β -Spezies (*in vivo* exprimiert) untersucht werden. Zuvor konnten die Einzelliganden in den Zellkulturassays die Menge an A β im Zellmedium teilweise stark reduzieren (D3_5+ auf 85 %, Trim_5+ auf 36 %). Eine Mischung aus beiden Liganden zeigte allerdings nur additive Effekte, der A β -Anteil wurde insgesamt auf 54 % reduziert. Reine Goldnanopartikel hatten in den Untersuchungen eine unspezifische Wirkung auf die A β -Fibrillen und der Anteil an A β sank im Zellmedium auf 51 % (Kapitel 3.1.4.5). Funktionalisierte Goldnanopartikel konnten allerdings sehr starke Effekte aufweisen, hier reduzierte der D3-Ligand auf Nanopartikeln die Menge auf 41 %, der Trimerligand sogar auf 28 %. Bifunktionale Nanopartikel konnten insgesamt eine Reduktion auf 29 % bewirken (**Abb. 151**).

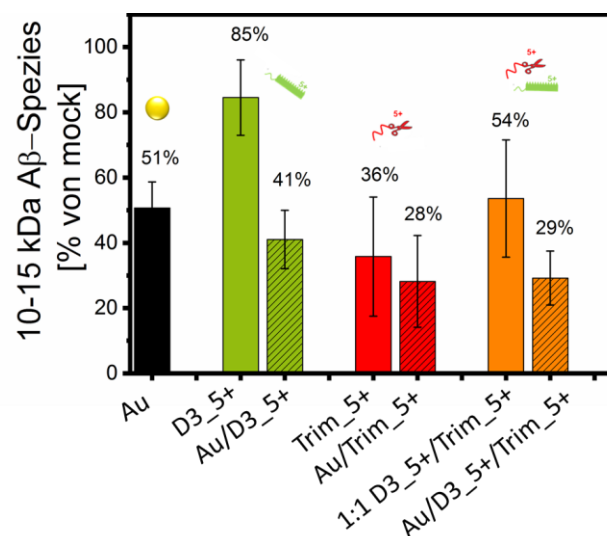


Abb. 151: Zusammenfassung der Zellkulturexperimentergebnisse: Es wurde der Einfluss der Testsubstanzen (D3_5+, Trim_5+ und eine 1:1 Mischung beider Liganden und die entsprechenden Konjugate) auf 10-15 kDa große A β -Spezies untersucht ($c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{Ligand}_{\text{monofunkt.}}) = 10 \mu\text{M}$, $c(\text{je Ligand}_{\text{bi-funkt.}}) = 5 \mu\text{M}$).

Die Wirkung der Hybridverbindung **48** auf *in vivo* exprimiertes A β wurde ebenfalls untersucht. Die getesteten Ligandenkonzentrationen waren hier 0.1 μ M und 3 μ M. Das Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis betrug 4 Liganden, bzw. 125 Liganden pro NP.

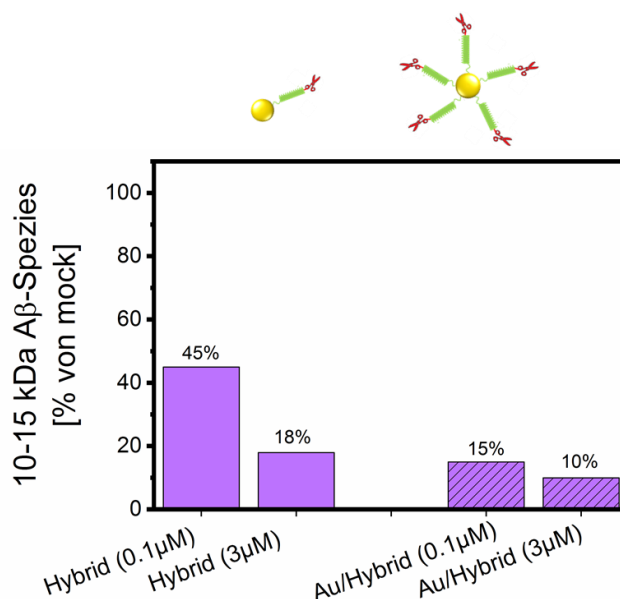


Abb. 152: Zusammenfassung der Zellkulturexperimente: Es wurde die Menge an 10-15 kDa großen A β -Spezies in Zellkulturassays durch Inkubation mit dem Hybridliganden, bzw. mit dem Hybridkonjugat in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht ($c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{Ligand}) = 0.1\text{-}3 \mu\text{M}$).

Die freie Hybridverbindung konnte bereits in sehr geringen Konzentrationen (0.1 μ M) die Menge an 10-15 kDa große A β -Spezies im Zellmedium auf 45 % reduzieren. Bei höheren Ligandenkonzentrationen (3 μ M) zeigte sich eine gesteigerte Wirkung der freien Liganden (Reduktion auf 18 %). Auf Nanopartikel immobilisiert reduzierten die Liganden den A β -Anteil im Zellmedium weiter auf insgesamt 10-15 %. (**Abb. 152**). Hier zeigte die Hybridverbindung eine wesentlich effektivere Wirkung als die Ligandenmischungen.

Die Überprüfung des Zellwachstums, bzw. der Viabilität der Zellen durch mikroskopische Aufnahmen der CHO-Zellen zeigten keine negative Beeinflussung durch die getesteten bifunktionalen Konjugate (**Abb. 153**).

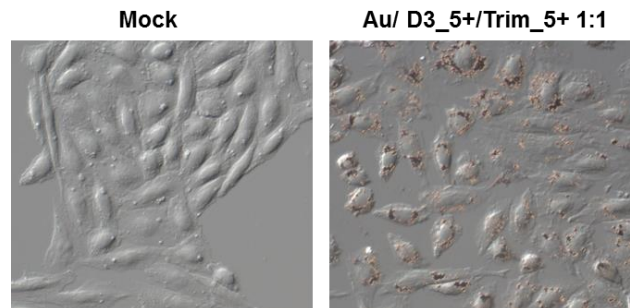


Abb. 153: Aufnahmen der CHO-Zellen mittels Lichtmikroskop nach vier Tagen Inkubationszeit.

Abb. 154 und **Abb. 155** zeigen die Ergebnisse weiterer Kontrollexperimente mit den Substanzen. Es konnte keine Apoptose der Zellen durch die Inkubation mit den Proben festgestellt werden. Ebenfalls wurde keine Beeinträchtigung der APP-Expression beobachtet.

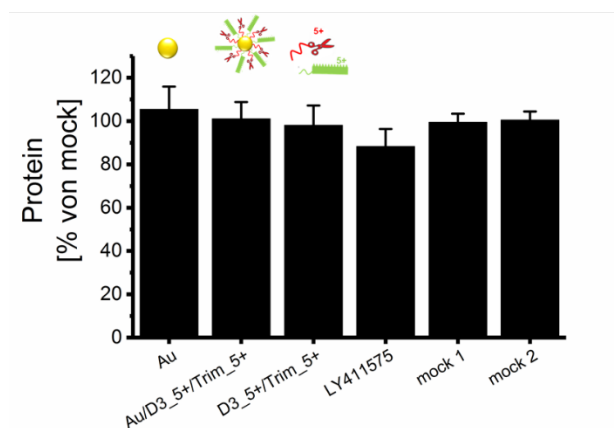


Abb. 154: Auswertung der Proteinkonzentrationsbestimmung nach einer Inkubation mit Goldnanopartikeln bzw. bifunktionalen 1:1-Ligandenmischungen frei und auf Nanopartikel immobilisiert (D3_5+/Trim_5+ und Au/D3_5+/Trim_5+).

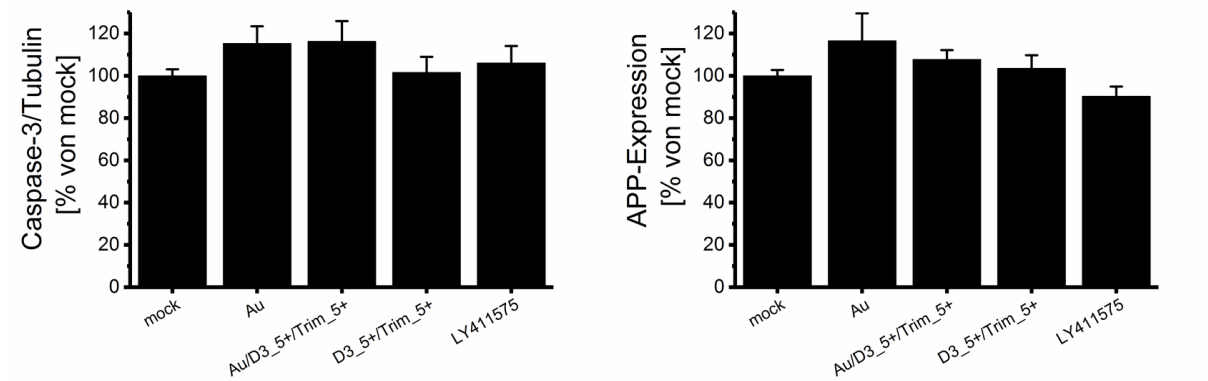


Abb. 155: Ergebnisse des Caspase-3-Assays (links) und der APP-Expression (rechts) nach einer Inkubation mit AuNP, 1:1 D3_5+/Trim_5+ und Au/D3_5+/Trim_5+.

In Zellkulturassays zeigte sich durchgehend eine Wirkverstärkung der Liganden durch Immobilisierung auf Goldnanopartikel. Bifunktionale Nanopartikel konnten moderat auf die A β -Menge im Zellmedium wirken und reduzierten deren Anteil um 70 %. Die 1:1-Mischung zeigte reduzierende Eigenschaften, welche zwischen den Ergebnissen der jeweiligen Einzelsubstanzen lagen. Allerdings weisen die Ergebnisse hier nur auf einen additiven und nicht auf einen synergistischen Effekt der beiden Liganden in den Experimenten hin.

3.3.3 Zusammenfassung

Für eine synergistische Wirksteigerung wurden zwei unterschiedliche Liganden auf einem Goldnanopartikel vereinigt. Bei zwei kationischen Liganden dominierte die Anziehungskraft der negativ geladenen Nanopartikeloberfläche gegenüber der elektrostatischen Abstoßung der Liganden untereinander. So konnten verschiedene Variationen in der Ligandendichte und in der Reihenfolge ihrer Zugabe auf die Nanopartikel getestet werden. Zudem wurde eine Hybridverbindung (**48**) aus den beiden Einzelsubstanzen, D3_5+ und Trimersäure, synthetisiert und als Vergleich zu den bifunktionalen Konjugaten herangezogen. Es konnten sowohl stabile Hybridkonjugate als auch stabile bifunktionale Konjugate hergestellt werden.

In Zetapotentialmessungen zeigte die Hybridverbindung im Gegensatz zu den Einzelsubstanzen bei identischer Ligandenkonzentration keine Ladungsumkehr im Zetapotentialwert. In früheren Experimenten zeigte eine sehr ähnliche Hybridverbindung **19** (Trimer-D3 ohne C-terminales Cystein) starke Tendenzen zur Selbstaggregation und Kolloidbildung. Die Einzelverbindung Trimer **13** war mäßig wasserlöslich, ein modifiziertes Derivat, Trim-TEG-RRRRR von *März-Berberich* war sogar nahezu wasserunlöslich. Obwohl in diesem Derivat fünf Arginine zur Erhöhung der Löslichkeit eingebaut wurden, konnte die Verbindung in keinem biophysikalischen Experiment eingesetzt werden.^[86] Auch die verwendete D3-Sequenz in der Hybridverbindung enthielt fünf Arginine, was wahrscheinlich ausschlaggebend für die schlechte Wasserlöslichkeit der ersten Hybridverbindungen **19** und nun auch als Ursache in der neuen Hybridverbindung **48** gewesen sein könnte. Durch das bestehende Löslichkeitsproblem immobilisierten demzufolge nur geringe Mengen an Liganden auf die Nanopartikel, so dass auch bei höheren Ligandenkonzentrationen die negative Ladung der Partikeloberfläche dominierte.

Bei UV/Vis-Spektren zeigte das Hybridkonjugat in Bezug auf die kolloidale Stabilität und auch bei der Bestimmung des SPR-Maximums generell andere Eigenschaften als die Einzelverbindungen. Bifunktionale Konjugate wiesen hier stärkere Ähnlichkeiten zu D3_5+-Konjugaten als zu Trim_5+-Konjugaten auf.

Weiterhin wurden unterschiedliche Mischungsverhältnisse bei bifunktionalen Konjugaten (1:10 und 1:1) und die Reihenfolge der Ligandenzugabe (sequentiell oder gleichzeitig) getestet. Es konnten stabile bifunktionale Konjugate durch die gleichzeitige Zugabe der Liganden zu den Goldnanopartikeln erhalten werden. Bei der sequentiellen Zugabe im 1:10-Ligandenverhältnis

konnte davon ausgegangen werden, dass der erste Ligand im Unterschuss vollständig immobilisierte, die Ladungsumkehr im Zetapotential erfolgte erst bei Zugabe des zweiten Liganden und deutete dadurch auf eine erfolgreiche Immobilisierung des letzten Liganden hin.

Im Hinblick auf die Ligandendichte zeigte bei einer sequentiellen Zugabe der zweite Ligand eine Konjugationseffizienz von 60 % (bei einer Zugabenreihenfolge von zuerst D3_5+ und dann Trim_5+). Eine Effizienzsteigerung auf 74 % konnte erzielt werden, wenn die Ligandenauswahl umgedreht wurde (Trim_5+ als erster Ligand, D3_5+ als letzter Ligand). Hier konnten ähnliche Werte bezüglich der Konjugationseffizienz wie bei den monofunktionalen Konjugaten beobachtet werden. Allerdings muss bei diesem Verhältnis davon ausgegangen werden, dass die Wirksamkeit der Konjugate nur auf den Liganden zurückzuführen ist, der im Überschuss vorlag und es somit nicht zu synergistischen Effekten durch zwei verschiedene Liganden kommen konnte. Bei einer zeitgleichen Zugabe der Liganden im 1:1-Verhältnis konnte bei sehr hohen und sehr niedrigen Konzentrationen jedoch eine nahezu gleichmäßige Ligandenverteilung auf der Partikeloberfläche erzielt werden, so dass hier eine Kooperativität der beiden Liganden möglich sein konnte.

Die Affinität zu dem A β -Peptid konnte, wie auch zuvor bei den Einzelverbindungen, durch die Ligandenkonjugation auf Nanopartikel gesteigert werden. Die Dissoziationskonstante bei bifunktionalen Konjugaten lag bei einem Wert von 2.3 nM. Dieser Wert ähnelte dem Wert von Au/D3_5+-Konjugaten (2.1 nM).

In ThT-Untersuchungen konnte die Mischung aus freien Liganden eine signifikante Reduzierung des Fibrillenanteils bewirken. Eine Immobilisierung der Ligandenmischung inhibierte die Bildung der A β -Fibrillen nahezu vollständig. Die Hybridverbindung als freie Ligandenlösung verringerte das Fluoreszenzsignal ebenfalls signifikant. Lagen diese Liganden auf Nanopartikeln immobilisiert vor, wurde die A β -Aggregation vollständig verhindert. Hier zeigten sowohl die bifunktionalen, als auch die Hybridkonjugate ähnlich starke reduzierende Effekte.

Bei den CD-Experimenten konnte die 1:1-Mischung eine ähnlich starke Wirkung auf die Sekundärstruktur von A β aufweisen wie die freien Trim_5+-Liganden. Die entsprechenden Konjugate konnten hier jedoch bessere Ergebnisse erzielen, sie lösten die β -Faltblattbande vollständig auf. Diese starke Wirkung konnte zuvor auch bei Au/D3_5+-Konjugaten beobachtet werden. Der Hybridligand auf Gold reduzierte auch in sehr geringen Konzentrationen die β -Faltblattstrukturen in der Probe vollständig. Die Hybridliganden in freier Lösung hingegen zeigten keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur des A β -Peptids.

Mittels AFM-Bildern wurde der Grad der Oberflächenbedeckung der A β -Fibrillen bestimmt. Es reduzierte sich der messbare Fibrillenanteil bei einer freien Ligandenmischung um den Faktor 1.9, bei den bifunktionalen Konjugaten sogar um den Faktor 3.2. Goldnanopartikel hatten hingegen keinen Einfluss auf die Oberflächenbedeckung.

Es konnte eine signifikante Unterdrückung des Fibrillenanteils durch bifunktionale Liganden und Konjugate in den DGZ/ELISA-Experimenten gemessen werden. Diese Wirkung konnte auch in ähnlich starkem Ausmaß bei den Untersuchungen mit dem D3_5+-Liganden beobachtet werden, der Trim_5+-Ligand alleine zeigte zuvor allerdings wesentlich schwächere Effekte. In dieser Methode ist demzufolge keine direkte synergistische Wirkung der beiden Liganden auf der Nanopartikeloberfläche zu beobachten. Dies resultierte möglicherweise aus den unterschiedlichen Wirkmechanismen der beiden Liganden: D3 diente als A β -Selektor und konnte somit das Peptid effektiver und stärker binden als die Trimerderivate.

Auch in Zellkulturassays konnten positive Ergebnisse erzielt werden. Hier lagen die Resultate bei der freien Ligandenmischung zwischen denen der Einzelsubstanzen. Auf Nanopartikel gebunden zeigte die Mischung eine vergleichsweise starke Reduzierung des A β -Anteils. Die Hybridverbindung auf Goldnanopartikeln zeigte bei niedriger Konzentration in den Experimenten die bisher stärksten Effekte. Auch die freien Hybridliganden waren hier sehr effektiv. Die Zellviabilität wurde bei allen getesteten Substanzen erhalten und die notwendige APP-Expression nicht gehindert.

3.3.4 Molekulares Modelling und Synthese eines neuen D3-Peptids

Neben den bisherigen Untersuchungen wurde noch eine weitere Synthesestrategie verfolgt, bei der einer der zuvor eingesetzten Liganden modifiziert werden sollte. Das Selektorpeptid D3 sollte weiter verlängert werden, so dass der Ligand durch einen größeren Abstand zur Nanopartikeloberfläche effektiver die A β -Sequenz, ohne sterische Hinderung der Trimerliganden, erkennen und binden könnte.

Vor Beginn der Synthese wurde mittels Moleküldynamik-Simulationen (MD) eine neue D3-Verbindung berechnet. Die MD-Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms Maestro 10.3 in Wasser in einem Kraftfeld OPLS-2005 und jeweils 1500 Schritten minimiert und durchgeführt. Basierend auf schon früheren Arbeiten bei Simulationen mit den Aminopyrazolliganden durch März-Berberich waren die Bindungsstellen zum A β bekannt.^[86] Darauf aufbauend konnten die Bindungsstellen für die D3-Sequenz an A β (1-42) bei bifunktionalen Konjugaten abgeleitet werden, da beide Liganden auf der Nanopartikeloberfläche immobilisiert vorlagen und

dies den Ausgangspunkt darstellte. So konnte der fehlende Spacer zwischen dem D3-Peptid und der Nanopartikeloberfläche rückwirkend bestimmt und somit der Abstand zwischen D3 und der Partikeloberfläche gezielt vergrößert werden. Damit keine zusätzlich negativen Wechselwirkungen des Spacers zum A β -Peptid auftreten konnten, wurde eine alternierende Reihenfolge aus Glycin- und Serinaminosäuren für den Spacer gewählt.

Zunächst musste die A β -Sequenz 1-42 errechnet und dargestellt werden. Das Ergebnis wird in Abb. 156 gezeigt.

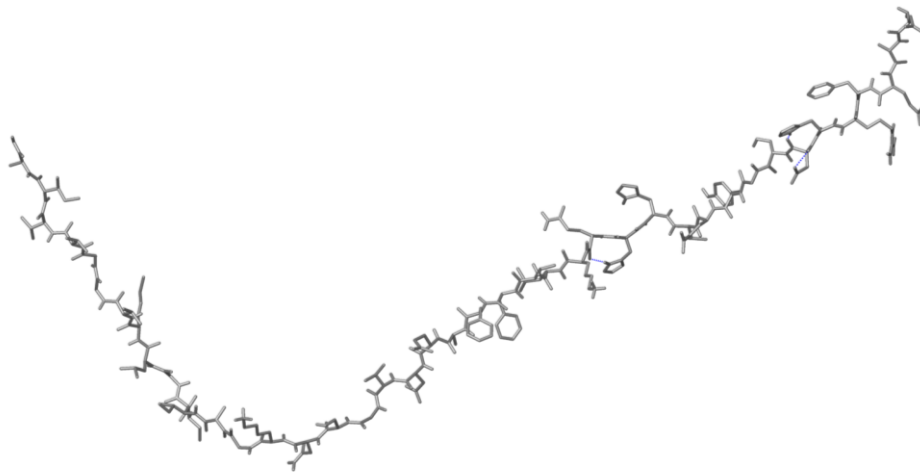


Abb. 156: Modell des Peptids A β (1-42).

Hierbei zeigte sich, dass die Peptidsequenz nicht gradlinig verlief, sondern einen leichten Knick in der Peptidstruktur aufwies. Darauffolgend wurde zu dem modellierten A β -Peptidstrang ein Trim₅₊-Ligand hinzugefügt. Es war bekannt, dass sich die trimere Aminopyrazoleinheit in die Phenylalanintaschen von A β einlagert. Die bevorzugte Bindungsstelle war demzufolge die KLVFF-Sequenz des A β -Peptids.^[86] Da der Trim₅₊-Ligand C-terminal auf einem Goldnanopartikel immobilisiert wurde, ergaben die MD-Berechnungen die dargestellte optimierte Strukturordnung in Abb. 157.

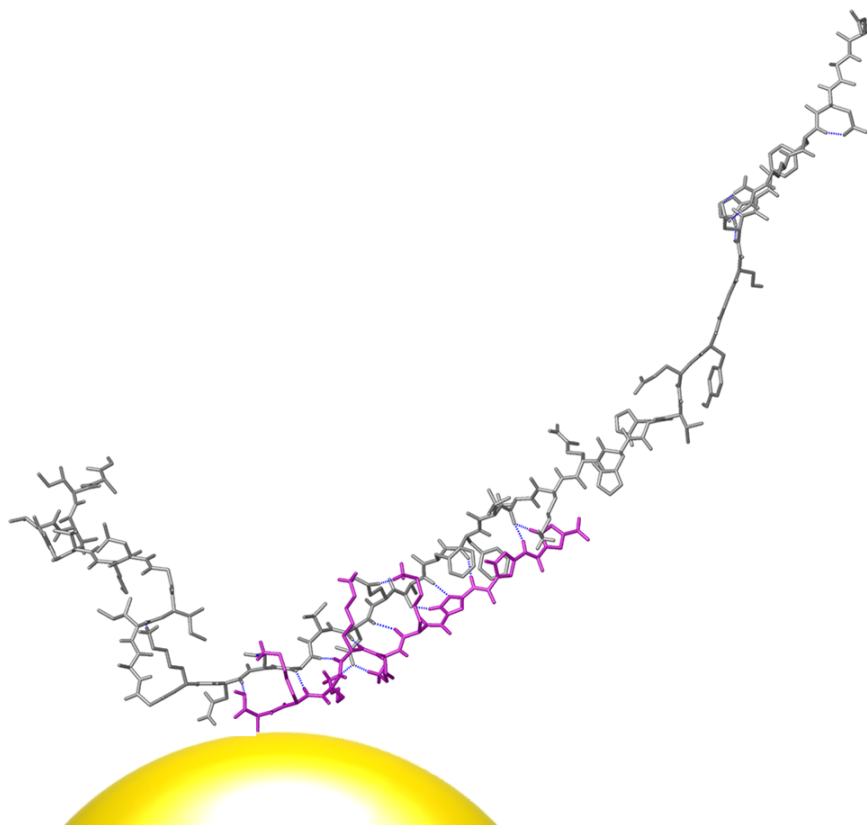


Abb. 157: Modell eines Komplexes aus A β (1-42) (grau) und Trim_5+ (lila). Trim_5+ lag auf Goldnanopartikel immobilisiert vor. Gebildete Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Peptid und dem Liganden sind in blau dargestellt.

Der immobilisierte Trim_5+-Ligand konnte hier insgesamt maximal 14 Wasserstoffbrückenbindungen und zusätzliche π - π -Stapelwechselwirkungen zu A β ausbilden.

Weiter wurde davon ausgegangen, dass beide Liganden, Trim_5+ und D3_5+ nebeneinander auf den Goldnanopartikeln immobilisiert vorlagen. In **Abb. 158** wird die resultierende minierte Komplexstruktur der beiden Liganden, gemeinsam an A β bindend, dargestellt.

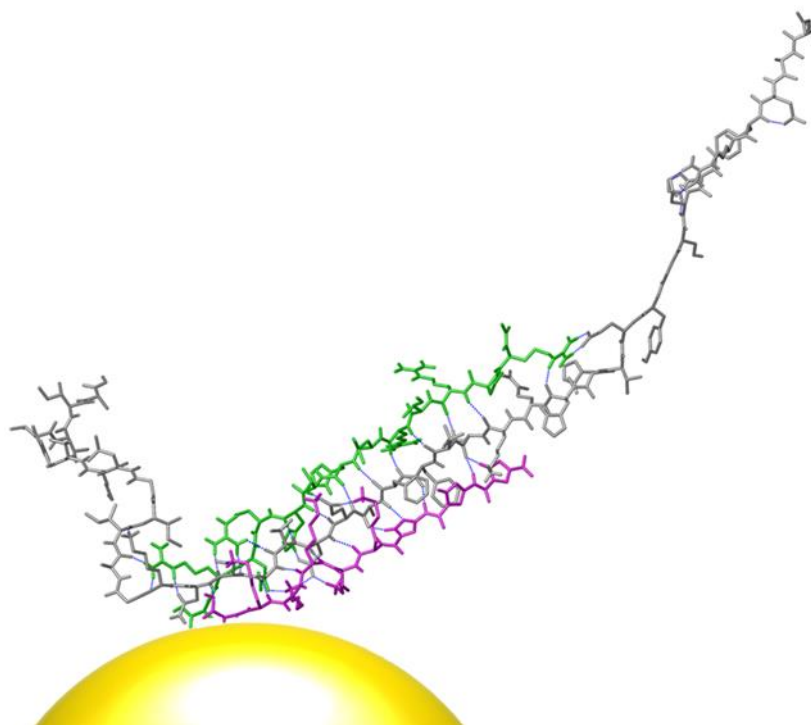


Abb. 158: Modell eines Komplexes bestehend aus Aβ(1-42) (grau) und Trim_5+ (lila) und D3_5+ (grün, welche auf Goldnanopartikel immobilisiert vorlagen. Gebildete Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Peptid und den Liganden sind in blau dargestellt.

Die D3-Einheit auf dem Goldnanopartikel erkannte das Aβ-Peptid und konnte an diesem binden. Zusätzlich wechselwirkte die trimere Aminopyrazoleinheit mit der Aβ-Sequenz. Zusammen konnten die beiden Liganden in den Berechnungen insgesamt 19 Wasserstoffbrückenbindungen zu Aβ bilden.

Es wurde deutlich, dass durch die annähernd gleiche Länge der beiden Liganden nur Interaktionen mit einer kleinen Region von Aβ stattfinden konnten. Wenn nun z.B. die Trimereinheit zentriert mit Aβ und der zweite Ligand an einer anderen Region der Aβ-Sequenz wechselwirken könnte, könnte dies eine Optimierung bei den bifunktionalen Liganden darstellen.

In **Abb. 159** ist das Ergebnis der neuen MD-Berechnungen der zwei Liganden auf Goldnanopartikel gezeigt.

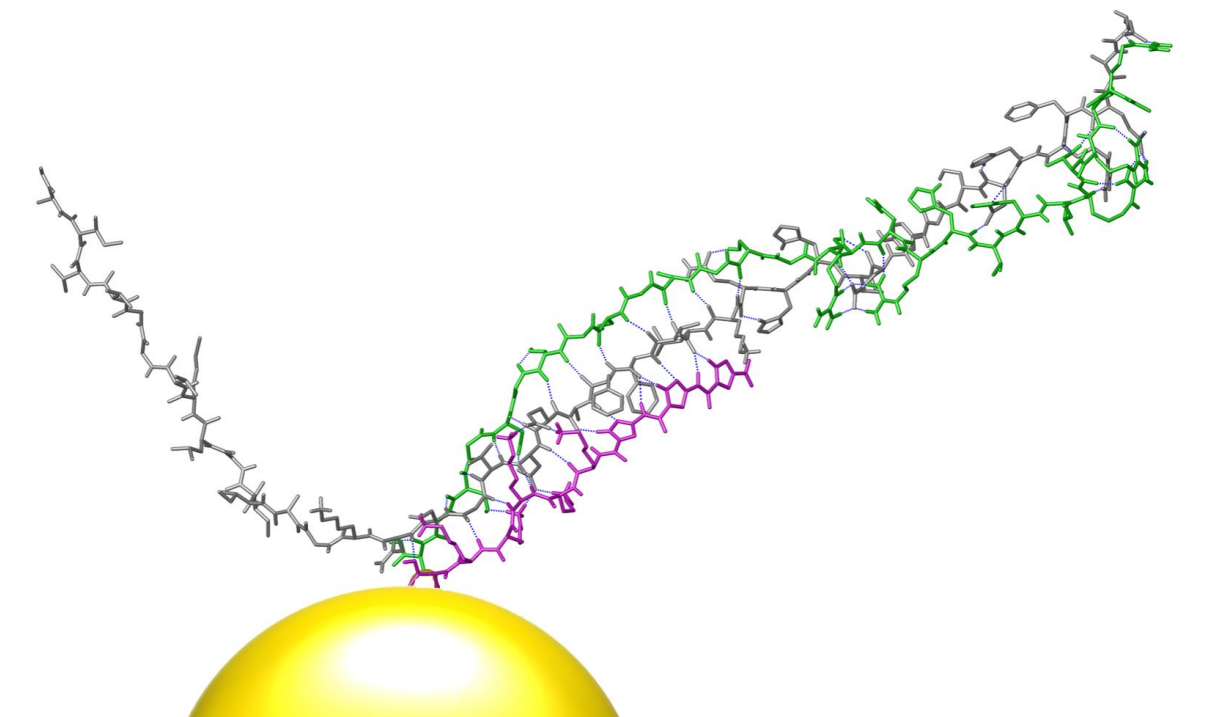


Abb. 159: Modell eines Komplexes bestehend aus Aβ(1-42) (grau) und Trim_5+ (lila) und D3-(SG)7C (grün), die beide auf einem Goldnanopartikel immobilisiert waren. Gebildete Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Peptid und den Liganden sind in blau dargestellt.

Beide Liganden konnten hier in den Simulationen mit verschiedenen Regionen von Aβ interagieren und so, neben den π - π -Stapelwechselwirkungen von Trim_5+, insgesamt 45 Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Aβ-Peptid ausbilden.

Die weitere Aufgabe bestand nun darin, das neu berechnete D3-Derivat, bestehend aus insgesamt 27 Aminosäuren, zu synthetisieren, anschließend als zweiten bifunktionalen Liganden auf die Goldnanopartikel zu bringen und die inhibierenden Eigenschaften des neuen Konjugats zu testen. Die Ergebnisse sind im Folgenden zusammengefasst.

Die Synthese der neuen D3-Einheit erfolgte analog zu der vorherigen D3-Ligandensynthesen mittels automatischem Festphasenpeptidsynthesizer (**Abb. 160**).

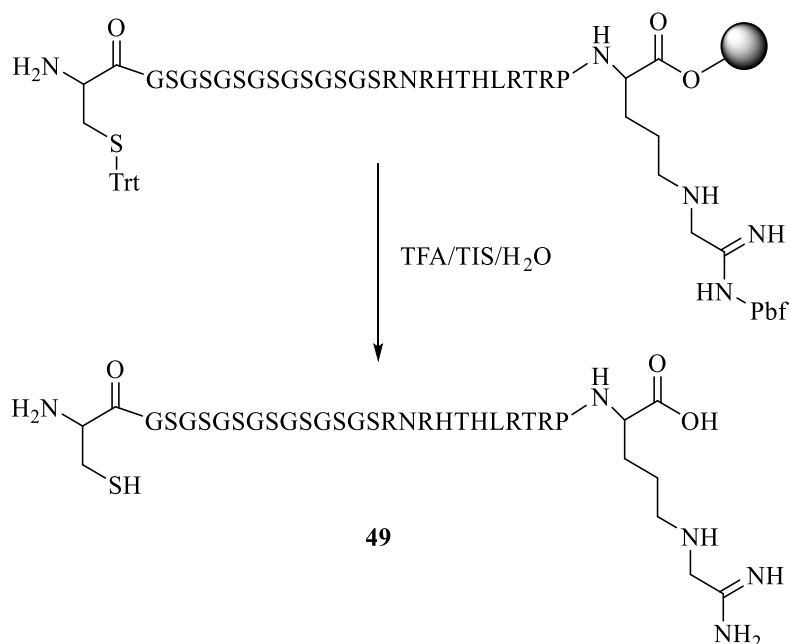


Abb. 160: Syntheschema zur Herstellung des neuen D3-Derivates D3-(SG)7C (**49**).

Nach Abspaltung vom Polymerharz mit TFA und gleichzeitiger Entfernung der Schutzgruppen, konnte das Peptid **49** aus Diethylether gefällt werden.

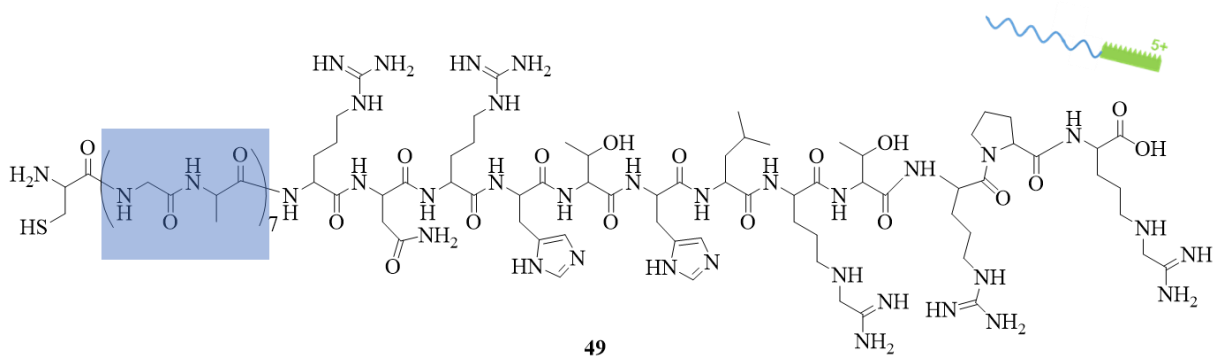


Abb. 161: Struktur von D3-(SG)7C (**49**).

Die Verbindung **49** besaß eine Nettoladung von +5, bestand aus insgesamt 27 Aminosäuren und konnte mit einer Reinheit von > 67 % erhalten werden. Durch den neu eingebauten (Glycine-Serin)₇-Spacer erhöhte sich ebenfalls die Wasserlöslichkeit des Peptids. So konnte die Verbindung ohne weitere Hindernisse auf Goldnanopartikel immobilisiert werden.

3.3.5 Goldnanopartikel mit neuem D3-Derivat D3-(SG)7C

In Stabilitätsuntersuchungen wurde das neue D3-Derivat (**49**) im Vergleich zum D3_5+ (**28**) untersucht. Durch den langen Glycin-Serin-Spacer konnten neue Eigenschaften beobachtet werden. In **Abb. 162** werden die Messergebnisse dargestellt.

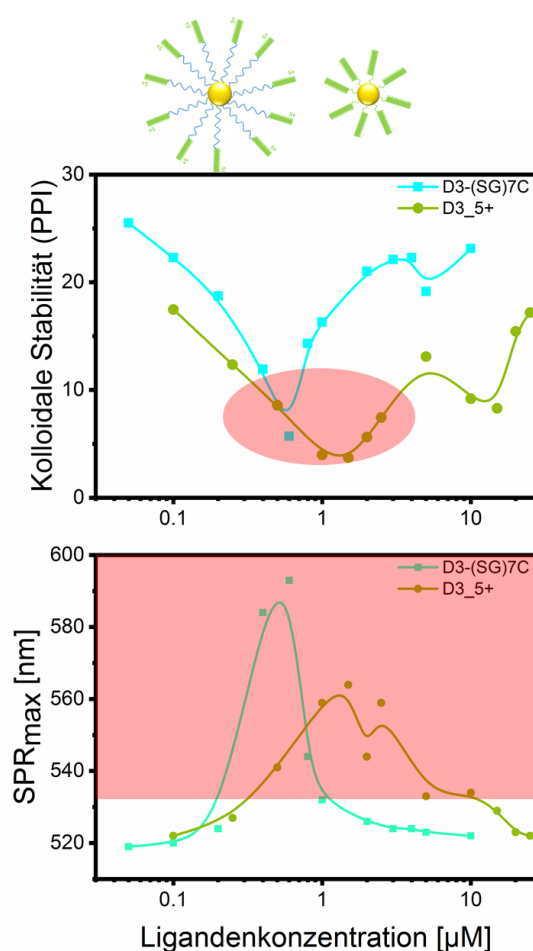


Abb. 162: Bestimmung der kolloidalen Stabilität (oben) und SPR-Spektrum (unten) von D3-(SG)7C in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandenkonzentration. Zum Vergleich ist zusätzlich der D3_5+-Ligand dargestellt.

Auch mit D3-(SG)7C konnten sowohl stabile kationische Konjugate (hohe Ligandenkonzentration) als auch stabile anionische Konjugate (niedrige Ligandenkonzentration) erhalten werden. Für stabile kationische Konjugate wurde weit weniger Ligandenkonzentration von D3-(SG)7C benötigt ($>1\mu\text{M}$) als bei den bisherigen D3-Derivaten.

Das Ziel war es nun, durch einen neuen D3-Liganden eine Wirksteigerung bei bifunktionalen Nanopartikeln zu erhalten. In den folgenden Kapiteln werden aus diesem Grund direkt die Einflüsse des Einzelliganden und als bifunktionales Konjugat gezeigt. Zum Vergleich wurden die Ergebnisse der Einzelverbindungen und die Ergebnisse der 1:1 bifunktionalen Liganden (D3_5+/Trim_5+) herangezogen.

3.3.6 Wirkung von Au/D3-(SG)7C auf A β (1-42)

3.3.6.1 ThT-Messungen

Mit Hilfe des amyloidspezifischen Fluoreszenzfarbstoffs ThT wurde die Verbindung **49** in ThT-Experimenten auf ihre aggregationsinhibierenden Eigenschaften getestet. Es wurde sowohl ein Liganden-zu-A β -Verhältnis von 6:1 als auch 0.06:1 untersucht. Als Vergleich diente die kürzere D3-Variante D3_5+ (**28**). Die Ergebnisse sind in **Abb. 163** dargestellt, die Werte sind in Prozent, bezogen auf die Kontrolle (= 100 %) angegeben.

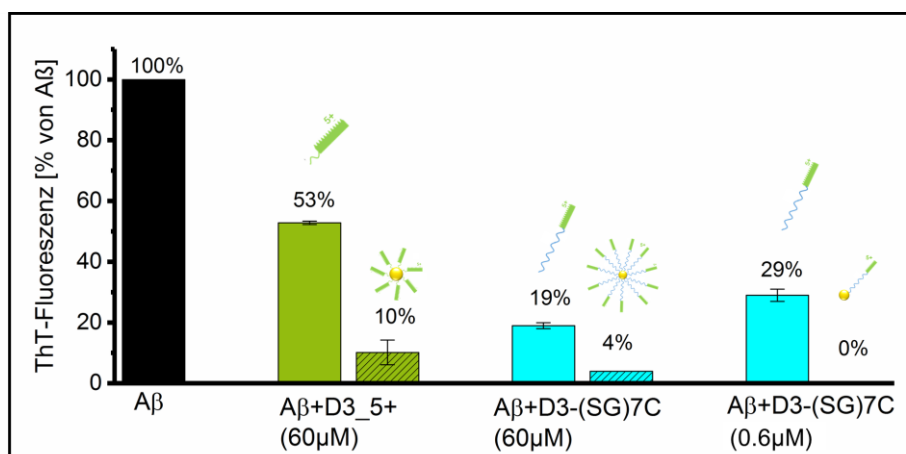


Abb. 163: Ergebnisse der ThT-Experimente von 10 μ M A β (1-42) (schwarz), A β mit D3_5+, bzw. Au/D3_5+ (grün) und A β mit D3-(SG)7C, bzw. Au/D3-(SG)7C (türkis) ($c(\text{AuNP}) = 300 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{Ligand}) = 60$, bzw. $0.6 \mu\text{M}$, $c(\text{A}\beta) = 10 \mu\text{M}$). Die Inkubation erfolgte für fünf Tage im Thermomixer bei 37 °C (650 rpm).

Das neue D3-Peptid konnte durch den Einbau des längeren Spacers sowohl frei, als auch auf Nanopartikel immobilisiert, eine stärkere aggregationsinhibierende Wirkung vorweisen als D3_5+. Die kürzere Variante (**28**) konnte als freier Ligand das Fluoreszenzsignal nur auf die Hälfte reduzieren, wohingegen die längere Variante (**49**) das Signal schon um über 80 % verringerte. Auf Nanopartikel konjugiert konnte die Verbindung **49** das Signal auf 4 % senken, das

kürzere D3-Peptid nur auf 10 %. Selbst bei Verwendung sehr geringer Mengen des neuen Liganden war noch eine sehr effektive Wirkung zu beobachten. Als freier Ligand wurde die Fluoreszenzintensität auf 29 % herabgesetzt, das Konjugat Au/D3-(SG)7C konnte das Signal vollständig reduzieren. Auch hier könnten allerdings durch die unbesetzten Stellen der Goldnanopartikeloberfläche unspezifische Wechselwirkungen mit den A β -Fibrillen aufgetreten sein.

Darauffolgend wurde der neue Ligand zusammen mit Trim_5+ als Mischung (frei und immobilisiert) getestet. Die Ergebnisse beider Testsubstanzen (D3-(SG)7C/Trim_5+ und Au/D3-(SG)7C/Trim_5+) wurden mit den Ergebnissen der ersten bifunktionalen Mischung (D3_5+ mit Trim_5+) verglichen (**Abb. 164**).

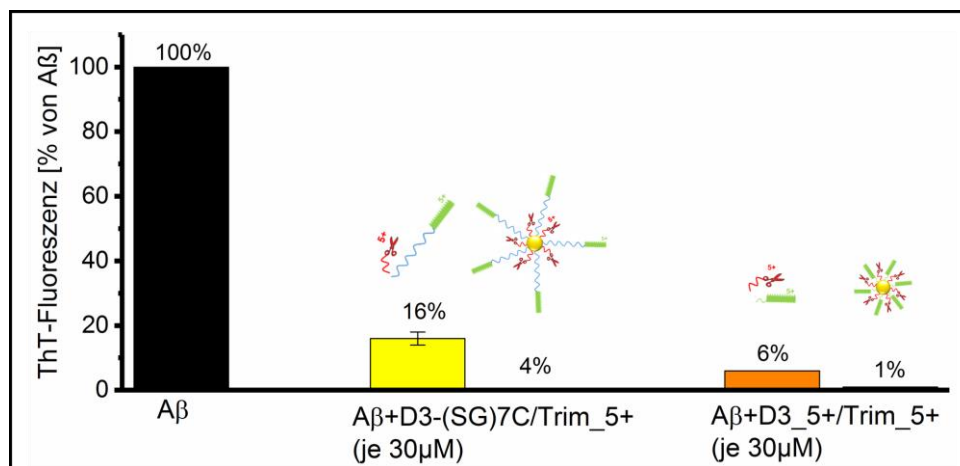


Abb. 164: Ergebnisse der ThT-Experimente von 10 μ M A β (1-42), A β mit einer 1:1-Ligandenmischung aus D3-(SG)7C/Trim_5+ (gelb) oder D3_5+/Trim_5+ (orange). Es wurden sowohl die freien als auch auf AuNPs immobilisierte Ligandenmischungen getestet ($c(\text{AuNP}) = 300 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{je Ligand}) = 30 \mu\text{M}$, $c(\text{A}\beta) = 10 \mu\text{M}$). Die Inkubation erfolgte für fünf Tage bei 37 °C im Thermomixer (650 rpm).

Die freie Ligandenmischung aus Trim_5+ mit D3-(SG)7C zeigte eine sehr starke Wirkung auf die A β -Aggregation. Freie Liganden setzten die Fluoreszenz auf 16 % herab, das Konjugat noch weiter auf 4 %. Allerdings wies die Ligandenmischung aus Trim_5+ mit D3_5+ eine außergewöhnlich starke Wirkung auf. Freie Liganden und Konjugate aus der Mischung verhiinderten die A β -Aggregation vollständig. Hier lieferte die neue D3-Variante zwar sehr gute Ergebnisse, allerdings konnte sie die vorherigen Ergebnisse mit D3_5+/Trim_5+ nicht übertreffen.

3.3.6.2 CD-Messungen

Weiter wurde getestet, ob der neue D3-Ligand **49** die Sekundärstruktur des A β -Peptids beeinflussen, bzw. stärker als D3_5+ beeinflussen konnte. Hierzu wurde das Peptid mit dem Liganden, bzw. Konjugat in äquivalenter Menge inkubiert. CD-Spektren wurden nach 0 h, 1 h und einem Tag aufgenommen. Die Ligandenspektren (bzw. Konjugatspektren) wurden zur Auswertung von den entsprechenden A β -Ligandenspektren (A β -Konjugatspektren) subtrahiert. Ebenfalls wurde in jedes Spektrum zum Vergleich ein CD-Spektrum von A β (1-42) nach 24 h Aggregationszeit abgebildet. Die aufgenommenen und ausgewerteten CD-Spektren sind in **Abb. 165** zusammengefasst.

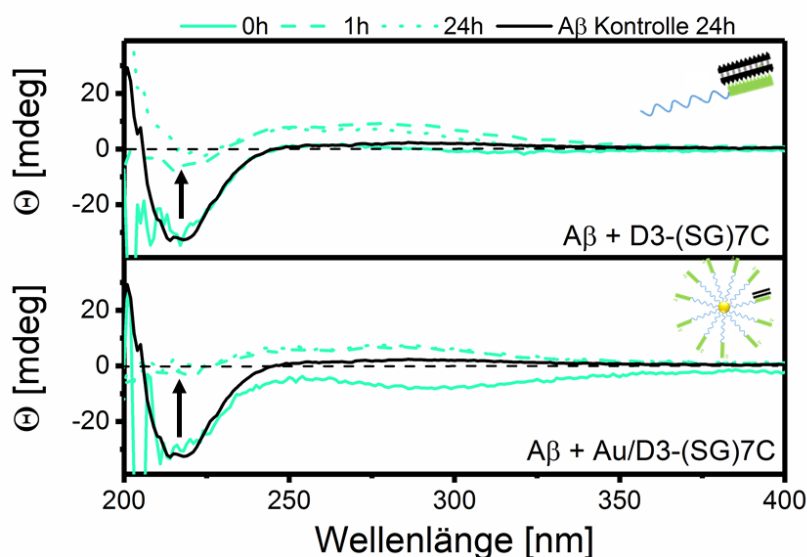


Abb. 165: CD-Spektren über 24 h von A β als Referenz (schwarz) und mit D3-(SG)7C (oben), bzw. mit Au/D3-(SG)7C (unten) inkubiert ($c(\text{A}\beta) = 10 \mu\text{M}$, $c(\text{Ligand}) = 10 \mu\text{M}$, $c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$).

Der freie Ligand konnte die Sekundärstruktur von A β nach 1 h Inkubationszeit stark destabilisieren. Die Immobilisierung auf Goldnanopartikeln zeigte eine sehr ähnliche Wirkung. Beide Substanzen konnten nach 1 h Inkubation die charakteristische Bande im Bereich um 220 nm vollständig auflösen.

Für die Untersuchungen bei bifunktionalen Konjugaten wurde die Mischung aus D3-(SG)7C mit Trim_5+ ebenfalls zu dem A β -Peptid gegeben und nach der entsprechenden Inkubationszeit vermessen.

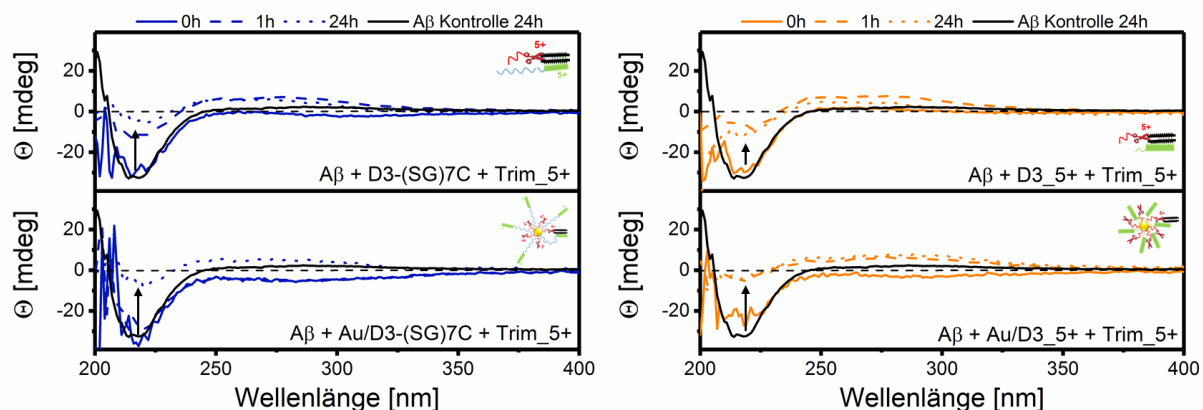


Abb. 166: CD-Spektren über 24 h von A β als Referenz (schwarz) und A β mit einer 1:1-Ligandenmischung aus D3-(SG)7C/Trim_5+ (links oben) und A β mit Au/D3-(SG)7C/Trim_5+ (links unten) inkubiert ($c(\text{A}\beta) = 10 \mu\text{M}$, $c(\text{je Ligand}) = 10 \mu\text{M}$, $c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$). Zum Vergleich die CD-Spektren von A β mit einer 1:1-Ligandenmischung aus D3_5+/Trim_5+, bzw. Au/D3_5+/Trim_5+ (rechts).

Abb. 166 stellt die Ergebnisse der beiden freien Ligandenmischungen und der beiden bifunktionalen Konjugate gegenüber. Im Vergleich zu dem einzelnen Liganden **49** zeigte die Mischung aus freien Liganden keine gesteigerte Wirkung. Das Konjugat hingegen besaß einen verzögerten Effekt auf die A β -Peptidkonformation, erst nach 24 h Inkubation konnte es die Bandenintensität bei 220 nm verringern. Der Einzelligand **49** zeigte diese Wirkung bereits nach 1 h Inkubation. Im Hinblick auf die freien Ligandenmischungen konnte ein Unterschied in der Effektivität zwischen D3_5+/Trim_5+ und D3-(SG)7C/Trim_5+ beobachtet werden. Das Konjugat Au/D3_5+/Trim_5+ konnte allerdings bereits nach einer Stunde die Intensität der negativen Bande verringern, das Konjugat Au/D3-(SG)7C/Trim_5+ erst nach 24 Stunden.

3.3.7 Zusammenfassung

Vor dem Synthesebeginn eines neuen D3-Derivats wurde mittels MD-Berechnungen ein optimierter Ligand erstellt, welcher im Modell eine gesteigerte Wechselwirkung mit A β in Zusammenarbeit mit Trim_5+ zeigte. Dieser Ligand konnte ebenfalls erfolgreich synthetisiert und erste Untersuchungen mit dem Derivat als Einzelligand, welcher einen langen peptidischen Spacer besaß, durchgeführt werden. Zusätzlich wurden Experimente in Kombination mit Trim_5+ unternommen.

Eine Immobilisierung auf Goldnanopartikeln lieferte stabile kationische Konjugate bei Verwendung hoher Ligandenkonzentrationen und auch stabile anionische Konjugate bei niedriger Ligandenkonzentration.

In ThT-Experimenten zeigte der neue D3-Ligand **49** eine stärkere inhibierende Wirkung als D3_5+ (**28**). Selbst bei sehr geringen Ligandenkonzentrationen war eine größere Reduzierung der A β -Fibrillen durch die freien Liganden erkennbar. Die neuen Goldkonjugate (Au/D3-(SG)7C) waren außergewöhnlich gute Aggregationsinhibitoren und konnten die Fluoreszenzintensität nahezu auslöschen. Bei den bifunktionalen Ligandenmischungen mit dem neuen D3-Derivat wurden ebenfalls gute inhibierende Eigenschaften beobachtet, eine Wirksteigerung wurde durch die Immobilisierung auf Nanopartikel erzielt. Allerdings zeigte das neue D3-Derivat **49** im Vergleich zum alten D3-Derivat **28** bei bifunktionalen Konjugaten keine verbesserten Ergebnisse.

Die Sekundärstruktur des A β -Peptids konnte durch die neue Verbindung **49** stark destabilisiert werden. Eine Wirksteigerung durch Immobilisierung der Liganden konnte allerdings nicht erzielt werden. Als zweiter Ligand bei bifunktionalen Konjugaten konnte D3-(SG)7C hingegen keine bessere Wirkung als D3_5+ aufweisen. Hier zeigte das alte D3-Derivat einen deutlich besseren Effekt auf die Konformationsänderung als Verbindung **49**.

In ersten Experimenten zeigte sich, dass der optimierte D3-Ligand D3-(SG)7C frei und als Konjugat sehr stark mit A β wechselwirkte. Allerdings konnte die Verbindung als bifunktionale Einheit keine neuen verbesserten Ergebnisse im Vergleich zu den bisherigen D3-Derivaten aufzeigen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Zusammenfassung

Eine Störung in der Proteinfaltung kann zur Bildung von extrazellulären ungeordneten Aggregaten und amyloiden Fibrillen führen. Diese Aggregatbildungen und toxischen Ablagerungen sind symptomatisch für viele Proteinfehlfaltungskrankheiten, wie z.B. Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder Chorea Huntington.^[206] Bei der Alzheimerschen Krankheit führt eine Sekundärstrukturänderung der A β -Monomere von einer α -helikalen in eine β -faltblattreiche Struktur zur Bildung kleiner neurotoxischer Aggregate und folglich zur Entstehung von unlöslichen A β -Fibrillen. Bis heute spielen deshalb das A β -Peptid und die Verhinderung seiner unkontrollierten A β -Aggregation zu kleinen Oligomeren und Fibrillen eine zentrale Rolle für die Entwicklung wirkungsvoller Therapeutika gegen die Alzheimerschen Krankheit.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Liganden entwickelt, die mit dem A β -Peptid interagieren und seine Aggregation beeinflussen konnten. Es wurden zwei unterschiedliche Ligandenarten (D3-Liganden und Aminopyrazolliganden) synthetisiert, um später eine synergistische Wirkung beider Liganden zusammen zu erzielen. Die beiden Ligandentypen wechselwirkten auf unterschiedliche Weisen mit A β und konnten somit die Aggregation auf verschiedene Wege verändern: Die D3-Peptidliganden fungierten als spezifische A β -Erkennungseinheiten, trimere Aminopyrazolliganden wiesen hingegen eine β -faltblattbrechende Aktivität gegenüber fehlgefalteten Peptiden auf.

Eine Besonderheit dieser Arbeit lag darin, nicht nur effektive neue Liganden herzustellen, sondern diese auch durch eine Thiolbindung auf ligandenfreie, biokompatible Goldnanopartikel zu immobilisieren und so funktionsfähige kleine Biokonjugate zu erhalten, die auf ihre inhibierende Wirkung gegenüber der pathologischen Aggregation des A β -Peptids untersucht werden konnten. In Kooperation mit der Technischen Chemie wurden mittels Laserablation kleine, monodisperse Nanopartikel ($d = 7$ nm) in wässriger Lösung produziert, die mit verschiedenen Ligandenkonzentrationen und Ligandenmischungen funktionalisiert werden konnten. Bei monofunktionalen Konjugaten konnte durch eine Variation in der Ligandenkonzentration die Ligandendichte auf der Nanopartikeloberfläche gesteuert werden. Es konnten stabile Konjugate

hergestellt werden, deren Goldoberfläche mit der maximalen Ligandenbelegung (418:1 Liganden-zu-Nanopartikel-Verhältnis, max. an die Oberfläche gebundene Liganden: 126 Trp-D3-Liganden, 161 Trim_5+-Liganden) gesättigt wurden und durch die mehrfach positive Einzellaadung auch eine deutlich positive Gesamtladung aufwiesen. Alternativ dazu wurden sehr geringe Ligandenmengen (4 Liganden pro Nanopartikel) eingesetzt, so dass noch die negative Goldnanopartikeloberfläche die Gesamtladung des Konjugats dominierte und ein stabiles, anionisches Konjugat hergestellt werden konnte.

Weiterhin konnten bifunktionale Konjugate durch eine Mischung der beiden Ligandentypen auf der Goldoberfläche erhalten werden. Die getesteten Mischungsverhältnisse der Liganden waren 1:1, 1:10 und 10:1. Zusätzlich zu den bifunktionalen Konjugaten, bei denen die beiden Ligandentypen nebeneinander auf dem Nanopartikel immobilisiert vorlagen, wurde eine neue Hybridverbindung aus beiden Ligandentypen (Liganden hintereinander geknüpft) synthetisiert und auf die Partikel gebracht.

Die synthetisierten Liganden und ihre Goldnanopartikelkonjugate wurden auf ihre Wechselwirkung mit dem A β -Peptid getestet. Es wurde der Einfluss der Substanzen unter anderem auf die A β -Sekundärstruktur (CD, ThT), die Morphologie der A β -Fibrillen (TEM, AFM) und auf die Größenverteilung von A β -Aggregaten unter verschiedenen Inkubationsbedingungen mittels DGZ untersucht. Die Aggregate konnten bei der Kombination aus DGZ/ELISA nach ihrer Masse und Form aufgetrennt und quantifiziert werden. Es wurde die Aggregationshemmung der Substanzen gegenüber synthetischem A β und in Zellkultur auch gegenüber *in vivo* exprimiertem A β erforscht.

Durch die hier angewandten unterschiedlichsten Methoden konnte die Wirkung der hergestellten Liganden, bzw. der Konjugate auf die verschiedenen A β -Spezies und bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen untersucht werden: So wurden die Substanzen in einigen Experimenten (ThT, CD, DGZ/ELISA) vor der Inkubation zu monomerem A β gegeben, so dass diese die A β -Aggregation direkt zu Beginn der Fibrillogenese inhibieren bzw. beeinflussen konnten. In anderen Experimenten, z.B. in AFM-Untersuchungen war eine Vorinkubation des A β -Peptids notwendig. Die Substanzen wurden zu den vorgeformten Fibrillen gegeben, so dass hier nicht nur eine Inhibierung der darauffolgenden A β -Aggregation, sondern hauptsächlich eine Desaggregation, bzw. Auflösung der Fibrillen erfolgte.

Die Affinität der Liganden gegenüber A β zeigte allerdings durchgängig in allen Experimenten, dass sie durch die Immobilisierung auf Goldnanopartikel signifikant gesteigert werden konnte (teilweise um das 7-fache erhöht). Durch Messungen der Thioflavin T-Fluoreszenz konnte die

Menge an A β -Fibrillen in Lösung bestimmt werden. Hier konnten alle getesteten Substanzen eine Reduktion des β -Faltblattgehalts erreichen. Bei den freien Einzelsubstanzen zeigte Trim_8+ selbst in sehr geringen Konzentrationen überragende inhibierende Eigenschaften. Ein Gemisch aus beiden Substanzen (D3_5+ und Trim_5+) konnte die A β -Aggregation ebenfalls effizient inhibieren. Es konnte eine synergistische Wirkung der beiden Verbindungen beobachtet werden. Die Immobilisierung der Liganden auf Nanopartikel führte bei allen Substanzen jedoch zu einer enorm gesteigerten aggregationsinhibierenden Wirkung, teilweise bis zu einer 53-fachen Verstärkung. Trotz der sehr starken Ergebnisse in den ThT-Untersuchungen musste hierbei berücksichtigt werden, dass bei dieser Methode nur eine Reduzierung des Fibrillenanteils gemessen werden konnte. Demnach wurden hier keine Substanzen identifiziert, die die wichtigen neurotoxischen Oligomeren reduzieren konnten. Es musste ebenfalls gewährleistet werden, dass die Bindungsstellen von A β für Thioflavin T zugänglich waren. Sobald die Epitope allerdings aufgrund der verschiedenen A β -Strukturen oder durch Bindung von anderen Molekülen an die Fibrillen unzugänglich waren, konnte dies zu falsch negativ Ergebnissen führen.^[207]

Es konnte außerdem eine Auflösung bzw. Veränderung der pathologischen β -Faltblattstruktur durch alle untersuchten Verbindungen beobachtet werden. So war in CD-Experimenten nachweisbar, dass die Liganden die Konformation des A β -Peptids effektiv destabilisierten. Auch hier wurde eine gesteigerte Wirksamkeit durch Immobilisierung der Liganden erzielt (sowohl bei mono- als auch bei bifunktionalen Konjugaten). Allerdings hing die Effektivität der Liganden von ihrer Wirkdauer ab. Die CD-Spektroskopie lieferte grundsätzlich nur Informationen über eine Konformationsänderung der Peptide ohne allerdings eine konkrete Aussage über die vorliegenden A β -Spezies in der Probe tätigen zu können.

In AFM-Bildern führten monofunktionale Au/D3-Konjugate zu einer Veränderung in der Morphologie der A β -Fibrillen, wodurch sich kürzere Fibrillenfragmente bildeten. Bifunktionale Konjugate konnten den Fibrillenanteil, im Gegensatz zu den monofunktionalen Konjugaten, um den Faktor 3.2 herabsetzen. Allerdings zeigten die Ergebnisse der Mikroskopieuntersuchungen nur die A β -Spezies, die zuvor auch auf der Substratoberfläche absorbierten. Diese Ergebnisse spiegelten möglicherweise nicht die gesamte A β -Verteilung in Lösung wider.

In DGZ/ELISA-Untersuchungen hatten die Konjugate stets eine stärkere Wirkung als die freien Liganden. Die Selektivität der D3-Derivate für oligomeres A β blieb auch nach der Immobilisierung auf der Goldnanopartikeloberfläche erhalten. Ebenfalls zeigten die D3-Derivate eine starke Wirkung auf größere A β -Fibrillen und konnten diese auch nach längerer Inkubationszeit

erfolgreich reduzieren. Allerdings führte ein Stabilisierungsversuch der Konjugate mit BSA zu einer Verschlechterung der Ergebnisse und schien die Interaktion zwischen Liganden und A β durch die BSA-Proteinen zu behindern.

Mit der Kombinationsmethode DGZ/ELISA wurden die A β -Spezies nach Aggregatgröße und Form aufgetrennt. So konnte in den Fraktionen durch Bestimmung der A β -Menge untersucht werden, welche A β -Formen von den Substanzen spezifisch unterdrücken werden konnten. Der Antikörper erkannte hierbei nicht einzelne A β -Spezies, sondern konkret die A β -Sequenz 1-16 des Peptids, so dass hier alle A β -Strukturen detektiert werden konnten. Allerdings sollte auch hier sichergestellt sein, dass diese Sequenz des A β -Peptids dem eingesetzten Antikörper zugänglich war. Demnach wäre eine Denaturierung der A β -Spezies in den Fraktionen vor dem ELISA sinnvoll, so dass der Antikörper nicht durch ungünstige Aggregatformationen an seiner Bindung gehindert werden kann.

Die ersten Tests mit *in vivo* exprimiertem A β bestätigten auch in Zellkulturexperimenten eine gesteigerte Wirkung nach der Immobilisierung der Liganden auf die Goldnanopartikel: Es wurden wesentlich geringere Konzentrationen an kleinen neurotoxischen A β -Aggregaten und N-terminal verlängerten Monomeren gebildet. Keine der getesteten Substanzen war zytotoxisch. Eine Optimierung des D3-Peptids zu D3-(SG)7C führte als monofunktionales Konjugat zu einer Erhöhung in der Wechselwirkung mit A β . In ThT-Experimenten konnte das neue Derivat die A β -Aggregation stärker inhibieren, bzw. das Fluoreszenzsignal nahezu auslöschen. Allerdings konnte die kürzere D3-Variante in bifunktionalen Experimenten bessere Ergebnisse erzielen: Die Kombination aus D3_5+ und Trim_5+ zeigte sowohl in ThT-, als auch in CD-Untersuchungen stärkere Wechselwirkungen mit A β als D3-(SG)7C mit Trim_5+.

Schlussendlich zeigten sich bei allen Experimenten jedoch eindeutige Trends: So konnte zusammenfassend festgestellt werden, dass alle neuen Liganden durch Immobilisierung auf Nanopartikel stets eine gesteigerte Wirkung in den durchgeführten Versuchen aufzeigten. Zusätzlich konnten erste bifunktionale Konjugate hergestellt werden, bei denen zum Teil eine synergistische Wirkung beider Liganden auf der Nanopartikeloberfläche beobachtet werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit konnten demnach erste erfolgreiche Ansätze für multifunktionale und multivalente Nanokonjugate für den Einsatz in Proteinfehlfaltungsprozessen gefunden werden.

Summary

A disruption in protein folding can lead to the formation of extracellular disordered aggregates and amyloid fibrils. These aggregate formations and toxic deposits are symptomatic for many protein misfolding diseases, e.g. Alzheimer's disease, Parkinson's disease or Huntingtons chorea.^[206] In the case of Alzheimer's disease, a secondary structure change of the A β monomers from an α -helical to a β -sheet rich structure leads to the formation of small neurotoxic aggregates and consequently the formation of insoluble A β fibrils. Until today the A β peptide and the prevention of its uncontrolled A β aggregation to small oligomers and fibrils play a central role for the development of effective therapies against Alzheimer's disease.

In this work new ligands have been developed which can interact with the A β peptide and influence its aggregation. Two different ligand species (D3 ligands and aminopyrazole ligands) were synthesized in order to achieve a synergistic effect of both ligands together. The two ligand types interact with A β in different ways and thus can alter the aggregation in various ways. The D3 peptide ligands functioned as specific A β -recognition units, while trimeric aminopyrazole ligands showed a β -sheet-breaking activity compared to misfolded peptides.

A particular feature of this work was not only to produce effective new ligands, but also to immobilize them through their thiol group at ligand-free, biocompatible gold nanoparticles to obtain functional small bioconjugates which have an inhibitory effect on the pathological aggregation of the A β peptide. In cooperation with Technical Chemistry small, monodisperse nanoparticles ($d = 7$ nm) were produced by laser ablation in aqueous solution, which could be functionalized with different ligand concentrations and ligand mixtures. In monofunctional conjugates the ligand density on the nanoparticle surface could be controlled by a variation in the ligand concentration. It was possible to prepare stable conjugates whose gold surface was determined by the maximum ligand coverage (418:1 ligand-to-nanoparticle ratio, maximum number of ligands bound to surface: 126 Trp-D3 ligands, 161 Trim_5+ ligands) and by the multiple positive single charge also had a clearly positive total charge. As an alternative to this, very small amounts of ligands (4 ligands per nanoparticle) were used so that the negative gold nanoparticle surface dominated the total charge of the conjugate and a stable, anionic conjugate could be prepared.

Furthermore, bifunctional conjugates could be obtained by a mixture of the two ligand types on the gold surface. The mixing ratios of the ligands tested were 1:1, 1:10 and 10:1. In addition to the bifunctional conjugates in which the two ligand types were immobilized side by side on the nanoparticle, a new hybrid compound was synthesized from both ligand types (ligands consecutively) and applied to the particles.

The synthesized ligands and their gold nanoparticle conjugates were tested for their interaction with the A β peptide. The influence of the substances on the A β secondary structure (CD, ThT), the morphology of the A β fibrils (TEM, AFM) and on the size distribution of A β aggregates under different incubation conditions by DGC has been examined. The aggregates could be separated and quantified according to their mass and shape by the combination of DGC/ELISA. The aggregation inhibition of the substances against synthetic A β and in cell culture against *in vivo* expressed A β was also investigated.

By the different methods used here the effect of the produced ligands, or the conjugates on the different A β species and under different incubation conditions could be investigated: Thus, in some experiments (ThT, CD, DGC/ELISA) the substances were added to monomeric A β prior to incubation, so that they could inhibit or influence A β aggregation directly at the beginning of the fibrillogenesis. In other experiments, e.g. in AFM studies a preincubation of the A β peptide was necessary. The substances were added to the preformed fibrils, so that not only an inhibition of the subsequent A β aggregation, but mainly a disaggregation or dissolution of the fibrils took place.

The affinity of the ligands with respect to A β showed, however, in all experiments that it could be significantly increased by immobilization on gold nanoparticles (partly increased by 7-fold). By measuring thioflavin T fluorescence, the amount of A β fibrils in solution was determined. Here, all the substances tested could achieve a reduction in the β -sheet content. The free Trim₈₊ ligand showed superior inhibitory properties even in very low concentrations. A mixture of both substances (D3₅₊ and Trim₅₊) was also able to inhibit the A β aggregation efficiently. A synergistic effect of the two compounds could be observed. However, the immobilization of the ligands on nanoparticle led to an enormously increased aggregationinhibiting effect for all substances, in some cases up to a 53-fold increase. Despite the very strong results in the ThT studies, it had to be taken into account that only a reduction of the fibril fraction could be measured with this method. Accordingly, no substances were identified that could reduce the important neurotoxic oligomers. It was also necessary to ensure that the binding sites

of A β were accessible to thioflavin T. However, as soon as the epitopes were inaccessible due to different A β structures or by binding other molecules to the fibrils, this could lead to false negative results.^[207]

Also a resolution or change of the pathological β -sheet structure could be observed by all investigated compounds. Thus, it was detectable in CD experiments that the ligands effectively destabilized the conformation of the A β peptide. Here an increased activity was achieved by immobilization of the ligands (both in mono- and bifunctional conjugates). However, the effectiveness of the ligands depended on their duration of action. CD spectroscopy basically provided only information on a conformational change of the peptides without being able to make a concrete statement about the present A β species in the sample.

In AFM images monofunctional Au/D3 conjugates resulted in a change in the morphology of the A β fibrils, resulting in shorter fibrillar fragments. Bifunctional conjugates could reduce the proportion of fibrils by a factor of 3.2 compared to the monofunctional conjugates. However, the results of the microscopy studies showed only the A β species, which previously also absorbed on the substrate surface. These results may not reflect the overall A β distribution in solution.

In DGC/ELISA studies, the conjugates always had a stronger effect than the free ligands. The selectivity of D3 derivatives for oligomeric A β was retained even after immobilization on the gold nanoparticle surface. However, a stabilization attempt of the conjugates with BSA resulted in a deterioration of the results and seemed to hinder the interaction between ligands and A β by the BSA proteins.

With the combination method DGC/ELISA, the A β species were separated according to aggregate size and shape. Thus, in the fractions, it was possible to determine which A β species could be specifically suppressed by the substances by determining the A β amount. The antibody did not recognize individual A β species but specifically the A β sequence 1-16 of the peptide, so that all A β structures could be detected. However, it should be also be ensured here that this sequence of the A β peptide was accessible to the antibody. Accordingly, a denaturation of the A β species in the fractions prior the ELISA would be useful so that the antibody can not be prevented from binding by unfavorable aggregate formations.

The first tests with A β expressed *in vivo* confirmed an increased effect in cell culture after the immobilization of the ligands on the gold nanoparticles: substantially lower concentrations of small neurotoxic A β aggregates and N-terminal extended monomers were formed. None of the tested substances were cytotoxic.

An optimization of the D3 peptide to D3-(SG)7C led to an increase in the interaction with A β as a monofunctional conjugate. In ThT experiments the new derivate was able to inhibit the A β aggregation more strongly and almost completely extinguish the fluorescence signal. However, the shorter D3 variant achieved better results in bifunctional experiments: the combination of D3_5+ and Trim_5+ showed stronger interactions with A β in both ThT and CD studies than D3-(SG)7C with Trim_5+.

Finally, however, there were clear trends in all experiments: thus, it could be summarized that all new ligands always showed an increased effect in the experiments carried out by immobilization on nanoparticles. In addition, first bifunctional conjugates could be prepared in which a synergistic effect of both ligands on the nanoparticle surface could be observed. Under this work, first successful approaches to the use of multifunctional and multivalent nanoparticles in protein misfolding processes could be made.

4.2 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere monofunktionale Konjugate aus aggregationsinhibierenden Liganden auf Goldnanopartikeln hergestellt. Dabei sollten weitere Experimente im Hinblick auf die Oberflächenbeladung der Konjugate erfolgen. Zum Beispiel könnten noch weitere Ligandenkonzentrationen neben den bisher verwendeten Konzentrationen getestet werden. Hier sollte bei Verwendung von hohen Ligandenkonzentrationen der Anteil an ungebundenen Liganden im Überstand reduziert werden, so dass die freien Liganden keinen Einfluss mehr auf die Ergebnisse nehmen können (z.B. durch Abtrennung der freien Liganden mittels Zentrifugation).

Bei anionischen Konjugaten traten möglicherweise zusätzlich unspezifische Wechselwirkungen zwischen A β und der noch unbesetzten Partikeloberfläche auf. Hier könnte eine abschließende Sättigung der Oberfläche mit neutralen Dummyliganden erfolgen, so dass die Nanopartikeloberfläche vollständig belegt ist (**Abb. 167**). Dabei würden sich Thiolverbindungen wie Liponsäure oder andere kurzkettige Alkanthiolderivate eignen. Ein positiver Nebeneffekt solcher Dummyliganden könnte eine erhöhte Partikelstabilität sein.^[208]

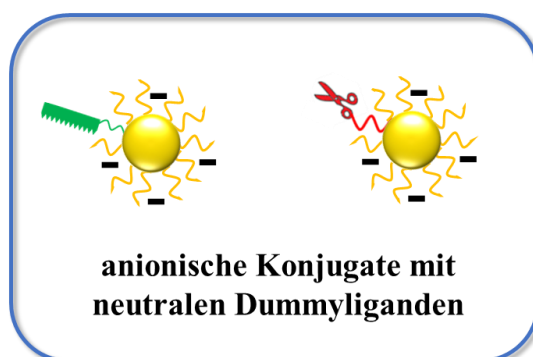


Abb. 167: Konzept zur Oberflächen sättigung durch neutrale Dummyliganden bei anionischen Konjugaten (D3-Einheit in grün, Aminopyrazolligand in rot, Dummyliganden in gelb).

Bei dem ersten durchgeführten Stabilisierungsversuch des Au/D3_5+-Konjugats mittels BSA als Stabilisatorprotein konnte nicht der gewünschte Effekt beobachtet werden. Die Zugabe von BSA verhinderte eine Interaktion der Liganden mit dem A β -Peptid. Wenn die entwickelten Konjugate später therapeutisch eingesetzt werden sollen, sind hier zwingend weitere Tests notwendig.

Die möglichen Wechselwirkungen der Konjugate mit anderen Proteinen, die im menschlichen Gehirn oder Körper vorkommen, müssen intensiv untersucht und die Konjugate dementsprechend angepasst werden.

Bei den bifunktionalen Konjugaten konnten zwei unterschiedlichen Liganden, die beide mit dem A β -Peptid interagierten, auf die Nanopartikeloberfläche immobilisiert werden. Neben dem kurzen D3_5+-Peptid wurde in dieser Arbeit das Peptid ebenfalls durch einen (SG)7-Spacer verlängert. Diese Modifizierung führte allerdings nur bei monofunktionalisierten Konjugaten zu einer gesteigerten Wirkung. Bifunktionale Konjugate mit dem verlängerten D3-Peptid **49** hingegen zeigten trotz vielversprechender Moleküldynamikberechnungen in den Experimenten keine stärkere Inhibierung der A β -Aggregation als das D3_5+-Peptid. Zukünftig sollten noch längere oder kürzere Spacerketten, wie z.B. PolyTEG- oder GABA-Spacer zwischen die Liganden (D3-Peptid oder Aminopyrazoltrimer) und die Thioleinheiten geknüpft werden (**Abb. 168**). Mit Hilfe weiterer Moleküldynamiksimulationen könnte der ideale Abstand zwischen den Funktionseinheiten und der Nanopartikeloberfläche berechnet werden und so die optimale Wechselwirkung zwischen den Liganden zum A β -Peptid erreicht werden.

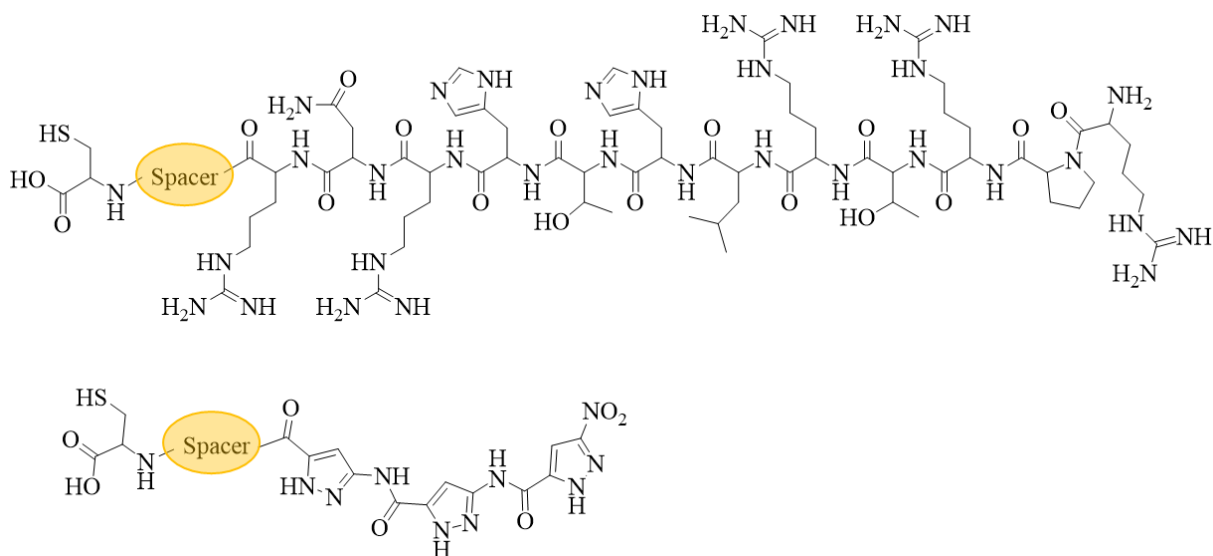


Abb. 168: Strukturvorschläge neuer D3- und Aminopyrazoligandeneinheiten.

Auch könnten noch weitere Ligandenverhältnisse bei den bifunktionalen Konjugaten getestet werden. In dieser Arbeit wurden nur die Verhältnisse 1:1, 1:10 und 10:1 untersucht. Andere Verhältnisse könnten eventuell zu einer höheren synergistischen Wirkung beider Liganden führen.

Es konnten, wie zuvor erwähnt, problemlos zwei unterschiedliche Liganden auf Nanopartikeln immobilisiert werden. Im nächsten Schritt könnte als dritte Funktionseinheit eine Protease auf die Nanopartikeloberfläche konjugiert werden. Hier würde sich die schon von Suh *et al.* untersuchte künstliche Protease, ein Co^{III} -Cyclen-Komplex, anbieten. Diese Einheit ist in der Lage, das A β -Peptid, insbesondere die löslichen A β -Oligomere, hydrolytisch zu spalten. Die Peptidhydrolyse erfolgt durch Polarisierung der Carbonylgruppe des Peptids durch das Co^{III} -Ion und anschließendem nucleophilen Angriff des Co^{III} gebundenen Hydroxidions am Carbonylkohlenstoffatom, wodurch ein tetraedrisches Intermediat entsteht. Durch Spaltung der Peptidbindung bilden sich die entsprechenden Carboxylat- und Amin-Ionen und der Komplex kann sich regenerieren (**Abb. 169**).^[209–211]

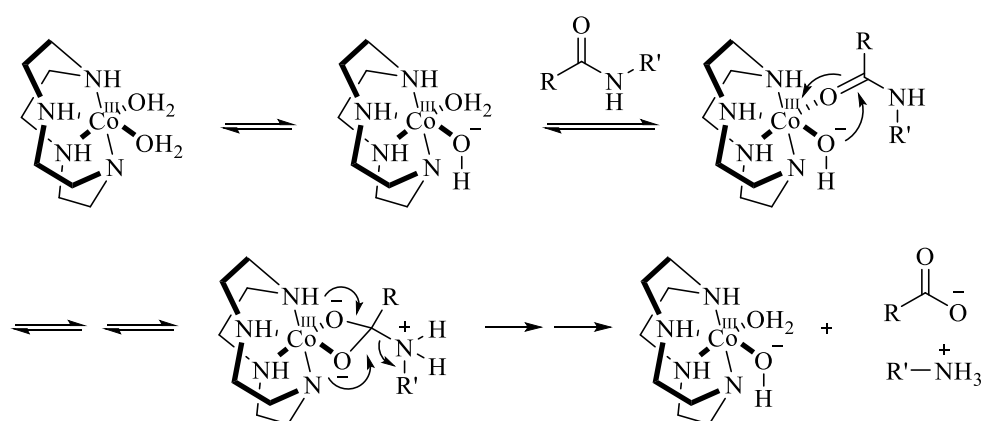


Abb. 169: Postulierter Mechanismus der Peptidspaltung durch einen Co^{III} -Cyclen-Komplex nach Chei *et al.*^[211]

In vorherigen Arbeiten konnte die Cycleneinheit mit einem Dodecyl-Spacer (**53**) verknüpft werden.^[90] Dieser Spacer sollte in weiteren Arbeiten in einem letzten Schritt mit einer endständigen Thiolgruppe versehen werden, damit die Immobilisierung der Proteaseeinheit auf Goldnanopartikel erfolgen kann (**Abb. 170**).

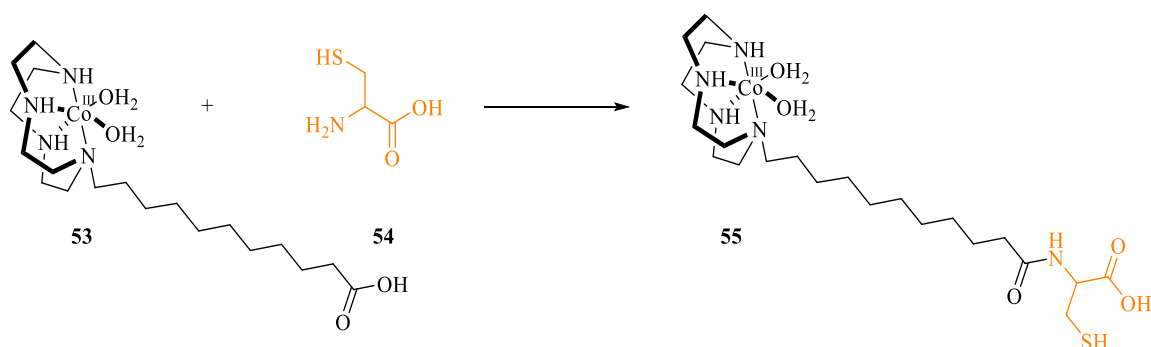


Abb. 170: Herstellung einer künstlichen Proteaseeinheit als dritter funktionaler Ligand auf Goldnanopartikeln.

Würden diese drei Funktionseinheiten (A β -Erkennungseinheit = D3-Derivat, β -faltblattbrechende Einheit = trimeres Aminopyrazol und künstliche Proteaseeinheit = Co^{III}-Cyclen-Komplex) gemeinsam auf einem Nanopartikel präsentiert werden, so könnte das A β -Peptid spezifisch gebunden, die β -faltblattreichen Strukturen aufgebrochen und anschließend das gesamte Peptid irreversibel gespalten werden (**Abb. 171**).

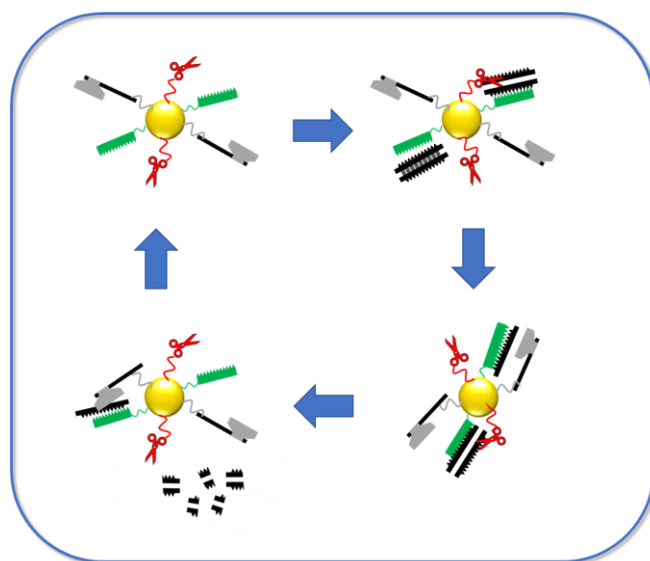


Abb. 171: Konzept des trifunktionalen Goldnanopartikelkonstruktes.

Im Hinblick auf den biologischen Aspekt sollten die Konjugate auf ihre Bluthirnschrankengängigkeit getestet werden. Die BBB-Gängigkeit ist hoch relevant für spätere *in vivo* Tests, z.B. in Mausmodellen, damit die Substanzen im Gehirn wirken können. Ebenfalls sollten die neuen Biokonjugate nicht nur auf die Untersuchungen mit dem Alzheimerpeptid A β beschränkt bleiben, sondern könnten auch auf ihre Wirkung bei anderen fehlgefalteten Proteinen untersucht werden. Neben dem A β -Peptid wird besonders dem Tau-Protein eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Alzheimer zugesprochen. Die Liganden und Konjugate könnten folglich z.B. auch auf ihre Wirkung in der Tauopathie getestet werden. Der Einsatz der neuen Konjugate würde so auf anderen Krankheiten ausgeweitet werden.

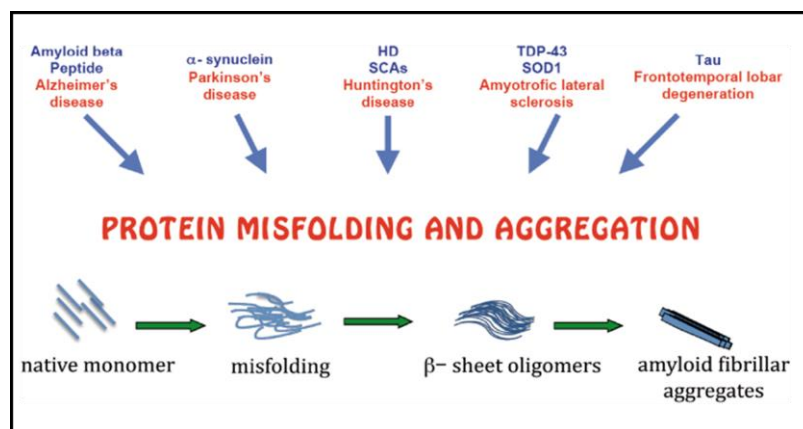


Abb. 172: Zusammenhänge zwischen Proteinfehlfaltungen, bzw. Proteinaggregationen und neurodegenerativen Krankheiten.^[212]

5 Experimenteller Teil

5.1 Material und Methoden

Chemikalien und Lösungsmittel

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen *Ba-chem*, *Fluka*, *Carbolution Chemicals*, *ChinaPeptides*, *Thermo Fisher Scientific* und *Sigma Aldrich* bezogen. Aminosäuren, Kupplungsreagenzien und Polymerharze für die Peptidsynthese wurden von den Firmen *Roth*, *Merck* und *Novabiochem* genutzt. Von den Firmen *Covance* (6E10) und *Dianova* (GAM-PO) wurden die Antikörper verwendet.

Je nach Bedarf wurden Lösungsmittel vor Gebrauch destilliert bzw. absolutierte Lösungsmittel über Molekularsieb getrocknet.

Verwendete Puffer

Thioflavin T, pH 7.3

Es wurde ein PBS-Puffer verwendet. Dieser bestand aus: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.4 mM KH_2PO_4 , 4.3 mM Na_2HPO_4 .

CD, pH 7.0

Hier wurde ein KaPi-Puffer eingesetzt. Die Zusammensetzung des Puffers bestand aus: 100 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$.

DGZ/ELISA, pH 7.4

Es wurde ein NaPi-Puffer eingesetzt. Dieser bestand aus: 81 mM Na_2HPO_4 , 1.9 mM NaH_2PO_4 . Zusätzlich wurde ein PBS-T Puffer genutzt. Die Zusammensetzung war hierbei: 136.9 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.9 mM KH_2PO_4 , 11.4 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0.2 % Tween20, aufgefüllt auf 1 L mit MilliQ-Wasser.

Ninhydrin-Test

Zur Überprüfung, ob eine Reaktion vollständig abgelaufen war, wurde nach einer Aminosäurekupplung eine Probe (4-5 mg) Peptid-Harz entnommen, mit einer Lösung aus 75 µl Phenol (80 % Phenol in Ethanol), 100 µl KCN-Lösung (2 mL einer 1 mM wässrigen KCN-Lösung in 98 mL Pyridin) und 75 µl Ninhydrinlösung (5 % Ninhydrin in Ethanol (w/v)) versetzt und für 5 Minuten auf 90 °C erwärmt. Bei noch vorhandenen freien Aminogruppen färbte sich die Lösung blau.

Dünnschicht- und Säulenchromatographie

Reaktionskontrollen wurden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) auf Alugram oder Polygram (SIL G/UV₂₅₄, 0.2 mm) DC-Platten der Firma *Macherey-Nagel* durchgeführt. Die Detektion der Substanzen erfolgte durch Absorption von UV-Licht bei 254 nm.

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die Kernresonanzspektren (¹H- und ¹³C-NMR) wurden bei Raumtemperatur mit dem Gerät Bruker Advance DMX300 (300 MHz), bzw. Bruker Advance DRX500 (500 MHz) der Firma *Bruker* aufgenommen. Die chemische Verschiebung (δ) wurde in ppm gegen das Lösungsmittelsignal (CDCl₃ = 7.26 ppm, bzw. (CD₃)₂SO = 2.50 ppm, D₂O = 4.79 ppm) kalibriert, die Kopplungskonstanten *J* sind in Hertz (Hz) angegeben. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm *MESTREC* der Firma *MESTRELAB RESEARCH*. Zur Beschreibung der Signalmultiplizitäten wurden die folgenden Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, breite Signale wurden durch ein vorangestelltes „br“ gekennzeichnet. Doppelte Buchstaben, wie z.B. dd bezeichnen ein Dublett vom Dublett.

HPLC-Chromatographie

HPLC-Messungen zur Peptidreinheit wurden mit einer Anlage der Firma *Jasco* mit einem UV/Vis-Detektor (UV-975, DG-2080-53 Lösungsmittelentgaser, LG-980-02S 3-Kanal-Lösungsmittelmischer) durchgeführt. Es wurde eine Trennsäule der Firma *Macherey-Nagel* (Modell EC 250/4 Nucleosil 100-3 C18) verwendet. Die Peptide wurden vor Auftragung auf die Säule in 0.1%iger TFA-Lösung gelöst. Die Auftrennung erfolgte mit einem Gradienten aus Wasser/Acetonitril mit 0.1 % TFA.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden an einem LC-MS System der Firma *Thermo Scientific* aufgenommen. Hierfür wurde eine *Agilent* Eclipse XDB-C18 (5 μm) Säule eingesetzt. Als Spektrometer diente ein LCQ FleetTM ESI-Spektrometer der Firma *Thermo Scientific*. Die Auftrennung erfolgte mit einem linearen Gradienten der Pufferlösung B (0.1 % CH_2O_2 in ACN) in Pufferlösung A (0.1 % CH_2O_2 in Wasser) mit einer Flussrate von 1 mL/min.

Nanosekundenlaser

Zur Herstellung der Goldnanopartikel wurde ein Nd:YAG Nanosekundenlaser Power Line E der Firma *Rofin* verwendet. Die Abtragung von Gold erfolgte bei einer Wellenlänge von 1064 nm und einer Pulsdauer von 8 ns (Pulsenergie: 367 μJ , Stromstärke: 34 A, Repetitionsrate: 15 kHz, Leistung: 5,5 W, Fokusabstand: 13,6 cm).

Zentrifugation

Für die Aufreinigung der Goldnanopartikel wurde eine Universal 32R Zentrifuge der Firma *Hettich* mit einem Winkelrotor 1612 eingesetzt (max. Drehzahl 18 000 rpm).

Analytische Scheibenzentrifugation (ADC)

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Nanopartikeldurchmessers mittels ADC diente eine analytische Scheibenzentrifuge (DC24000) des Herstellers *CPS Instruments*. Die wurde die Disc Centrifuge Control System Software verwendet. Der Messbereich lag bei 3 - 300 nm, die maximale Zentrifugationsgeschwindigkeit bei 24 000 rpm.

UV/Vis-Spektroskopie

Zur Aufnahme der UV/Vis-Spektren wurde ein Evolution 201 UV/Visible-Spektrophotometer der Firma *Thermo Scientific* eingesetzt. Die zu untersuchenden Proben wurden in einer 1.5 mL Quarz-Küvette ($d = 0.1$ cm) vermessen. Der gemessene Wellenlängenbereich lag bei 190 – 900 nm (Bandbreite 1 nm, Integrationszeit 0.05 s, Scangeschwindigkeit 120 nm/min).

Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zetapotentialmessungen

DLS-Messungen wurden in einer Kunststoffzelle DTS-1070 an einem Zetasizer Nano ZS der Firma *Malvern* bei 25 °C durchgeführt.

Zur Bestimmung des Zetapotentials bei 25 °C wurde ebenfalls der Zetasizer Nano ZS der Firma *Malvern* (Software Zetasizer 7.02, Zetapotential $> \pm 500$ mV, Genauigkeit $0.12 \mu\text{m.cm/V}$, 4 mW He-Ne Laser, $\lambda = 633$ nm) verwendet.

Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Für die Aufnahme von AFM-Bildern auf Mica (*Plano GmbH*) diente ein MultiMode 8 Mikroskop mit ScanAsyst-Air der Firma *Bruker*. Es wurden Messspitzen aus Silikon mit Nitrid-Cantilever (0.4 N/m, *Bruker*) bei einer Abtastrate von 0.977 Hz, einer Geschwindigkeit von $5.86 \mu\text{m/s}$ im *tapping mode* verwendet. Die Auswertung der Proben erfolgte mit dem Programm NanoScope Analysis (Version 1.5, *Bruker*) und ImageJ (*National Institute of Health*).

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

TEM-Bilder wurden mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops JEOL JEM-2200FS der Firma *JEOL*, bzw. mit einem TEM CM 12 der Firma *Philips* aufgenommen. Die Beschleunigungsspannung lag bei max. 120 kV mit einer max. Auflösung von ca. 0.5 nm und mit einer Standardvergrößerung von $2050 - 660\,000\times$ (CM 12). Die Auswertung erfolgte mit der Software ImageJ (*National Institute of Health*).

Fluoreszenzspektroskopie

Alle Fluoreszenzmessungen wurden an einem Spektrometer InfiniTe 200 der Firma *Tecan* aufgenommen. Thioflavin T Fluoreszenzmessungen wurden bei 37 °C, Bindungsexperimente und ELISA-Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt.

CD-Spektroskopie

Zur Aufnahme von CD-Spektren wurde ein *Jasco* J-815 CD-Spektrometer verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden in einer Quarz-Küvette ($d = 0.1$ cm) vermessen.

Ultrazentrifugation (UZ)

Für die Ultrazentrifugation bei der Dichtegradientenzentrifugation wurde eine Optima Max XP Ultrazentrifuge der Firma *Beckmann Coulter* mit einem festen Winkelrotor MLA-55 bei einer relativen Zentrifugationskraft von 287 000 g eingesetzt.

Licht- und Konfokalmikroskopie

Für die Visualisierung der Zellen wurde das Lichtmikroskop Axiovision Apotome.2 der Firma *Zeiss* mit verschiedenen DIC Filtern verwendet.

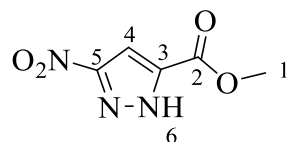
Für Aufnahmen mit sehr hohem Kontrast wurde das Leica SP8 gSTED Konfokalmikroskop der Firma *Leica* herangezogen.

Kraftfeldrechnungen

Kraftfeldrechnungen wurden mit dem Programm Maestro 10.3 der Firma Schroedinger durchgeführt. Die Komplexstrukturen wurden mit dem Kraftfeld OPLS-2005 in Wasser minimiert.

5.2 Synthese des Trimersäurebausteins^[83]

Synthese von 3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **36**



In 150 mL trockenes Methanol wurde 30 min $\text{HCl}_{(\text{Gas})}$ geleitet und anschließend mit 5.44 g 3-Nitropyrazol-5-carbonsäure **35** (34.63 mmol; 1.0 äq) versetzt. Die hellgelbe Reaktionslösung wurde für 18 h zum Rückfluss erhitzt und das Lösungsmittel im Anschluss am Rotationsverdampfer entfernt. Nachdem der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet wurde, konnte das Produkt 3-Nitropyrazol-5-carbonsäuremethylester **36** erhalten werden.

Ausbeute:	5.84 g	93 %	(34.15 mmol)
Molare Masse:	171.03 g/mol		
Chemische Summenformel:	$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_4$		

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm] = 3.89 (s, 3H, H-1), 7.52 (s, 1H, H-4).

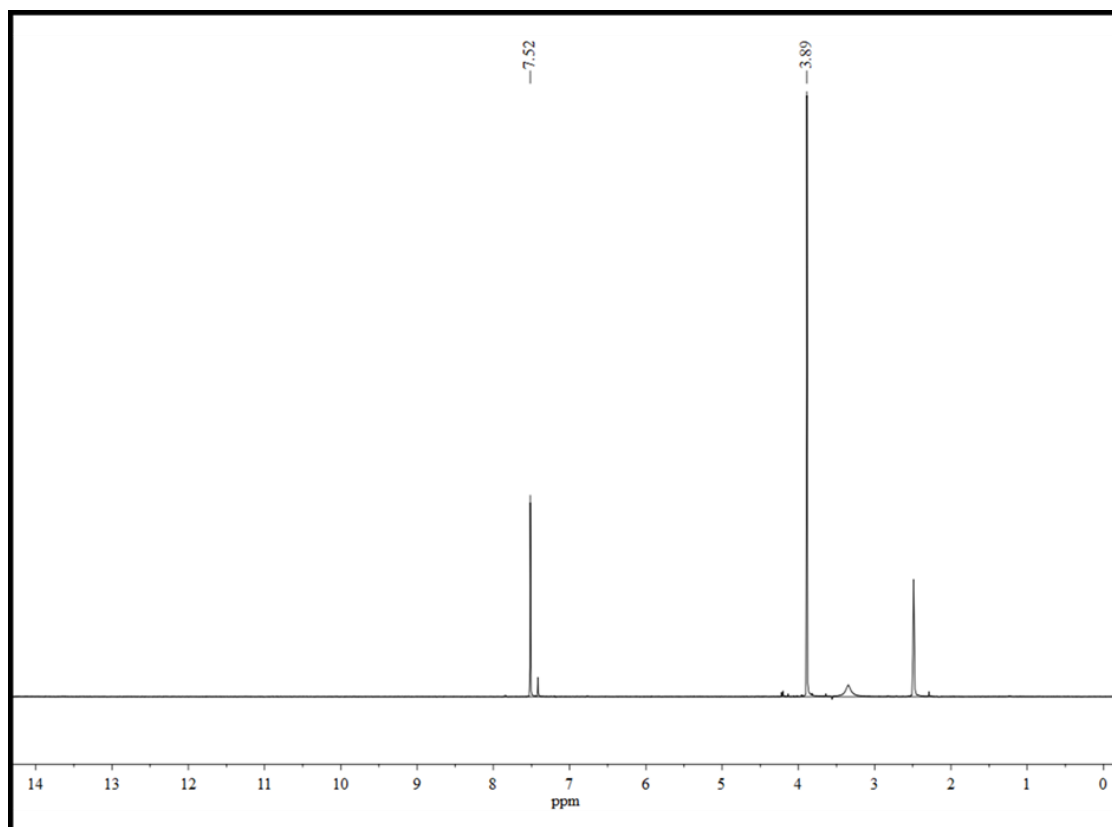
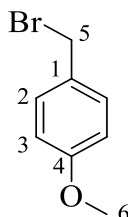


Abb. 173: ^1H -NMR-Spektrum von 3-Nitro-1H-pyrazol-5-carbonsäuremethylester 36 (300 MHz, DMSO- d_6).

Synthese von 4-Methoxybenzylbromid **37**

6.19 mL 4-Methoxybenzylalkohol (49.73 mmol, 1.0 äq) wurden in 77 mL Diethylether gelöst und die Lösung auf 0 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurden 21 mL Bromwasserstoff (48%ig in Wasser) langsam hinzuge tropft und für 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 53 mL gesättigter Natriumbromid-Lösung versetzt und die organische Phase zuerst über Kaliumcarbonat, dann über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Membranpumpenvakuum entfernt. Das entstandene Produkt **37** musste anschließend kalt gelagert werden.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 3.75 (s, 3H, H-6), 4.45 (s, 2H, H-5), 6.82 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-3), 7.27 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-2).

Ausbeute:	10.48 g	95 %	(52.13 mmol)
Molare Masse:	201.06 g/mol		
Chemische Summenformel:	C ₈ H ₉ BrO		

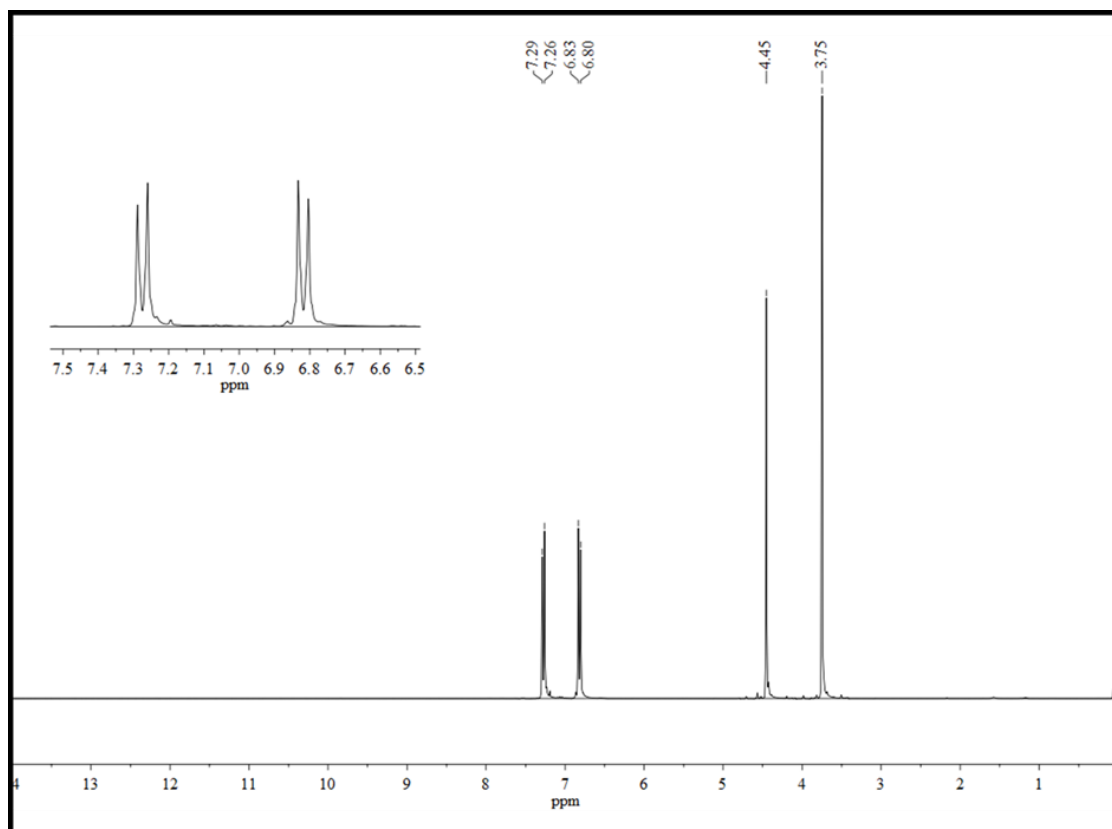
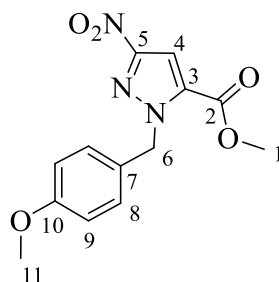


Abb. 174: ^1H -NMR-Spektrum von 4-Methoxybenzylbromid 37 (300 MHz, CDCl_3).

Synthese von *N*-*p*-Methoxybenzyl-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **38**

Es wurden 2.01 g 3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **36** (12.78 mmol, 1.0 äq) in 35 mL absolutem DMF gelöst und 3.85 g 4-Methoxybenzylbromid **37** (19.17 mmol, 1.5 äq) und 3.53 g Kaliumcarbonat (25.56 mmol, 2.0 äq) hinzugegeben. Die Lösung wurde zuerst 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend 20 h bei 50 °C gerührt. Die Lösung wurde mit 1 M HCl auf pH = 1 eingestellt und vier Mal mit je 35 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das weiße Produkt **38** kristallisierte bei 8 °C aus.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.72 (s, 3H, H-11), 3.88 (s, 3H, H-1), 5.73 (s, 2H, H-6), 6.89-6.92 (m, 2H, H-9), 7.23-7.236 (m, 2H, H-8), 7.58 (s, 1H, H-4).

Ausbeute:	1.17 g	31 %	(4.01 mmol)
Molare Masse:	291.26 g/mol		
Chemische Summenformel:	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O ₅		

R_f-Wert: 0.4 in 3:1 Cyclohexan/Ethylacetat

Nach weiterem Auskristallisieren:	1.86 g	50 %	(6.40mmol)
-----------------------------------	--------	------	------------

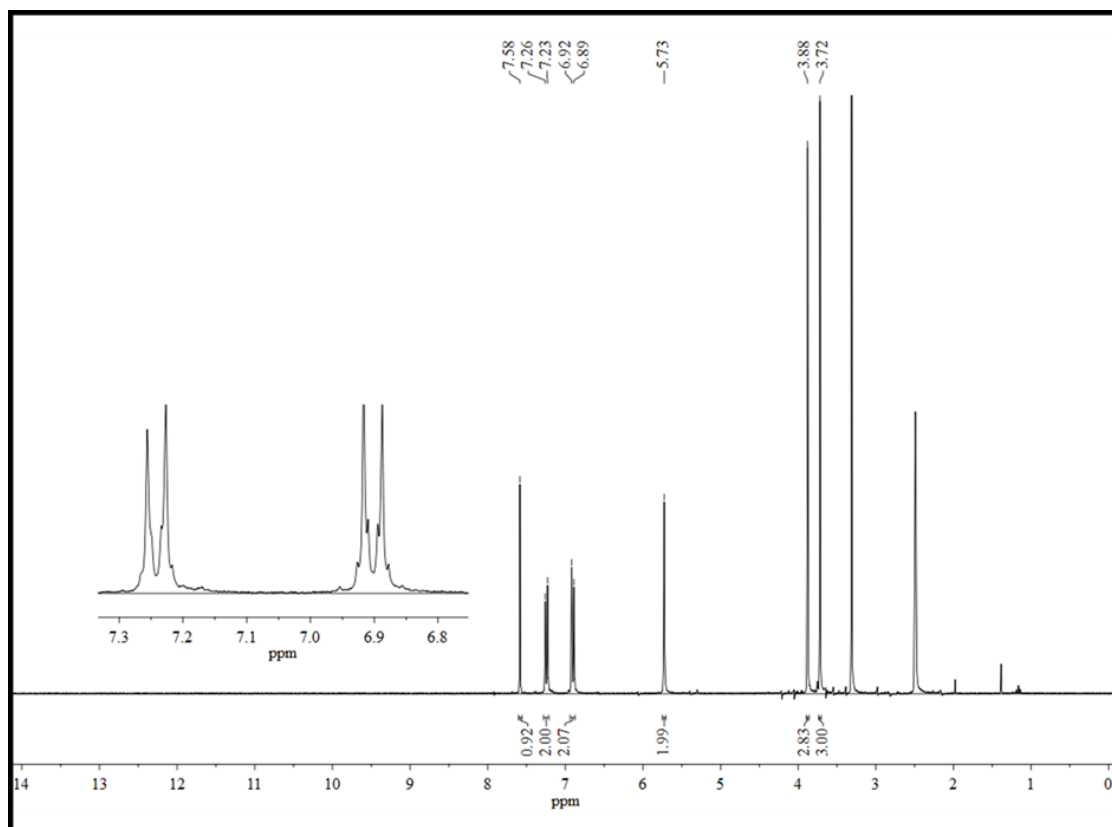
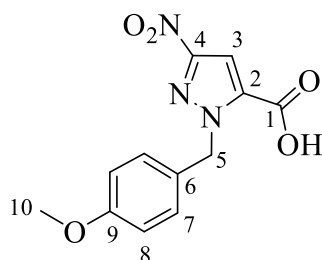


Abb. 175: ¹H-NMR-Spektrum von *N*-*p*-Methoxybenzyl-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester 38 (300 MHz, DMSO-d₆).

Synthese von *N*-*p*-Methoxybenzyl-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carbonsäure **39**

Es wurden 637.4 mg *N*-*p*-Methoxybenzyl-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **38** (2.19 mmol, 1.0 äq) in 7 mL Methanol und 7 mL THF gelöst. Zu dieser Lösung wurden 1.5 mL bidest. Wasser und 153.1 mg Lithiumhydroxid Monohydrat (3.65 mmol, 1.65 äq) gegeben und das Reaktionsgemisch für 12 h zum Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand in bidest. Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 1 eingestellt und der ausgefallene Niederschlag abfiltriert. Dieser wurde mit HCl gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

Anschließend wurde das Filtrat noch einmal mit DCM extrahiert, die vereinten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.71 (s, 3H, H-10), 5.74 (s, 2H, H-5), 6.89-6.91 (d, J = 8.8 Hz 2H, H-8), 7.21-7.23 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-7), 7.49 (s, 1H, H-3).

Ausbeute:	604.5 mg	100 %	(2.18 mmol)
Molare Masse:	277.07 g/mol		
Chemische Summenformel:	C ₁₂ H ₁₁ N ₃ O ₅		

R_f-Wert: 0.27 in 3:1 Cyclohexan/Ethylacetat

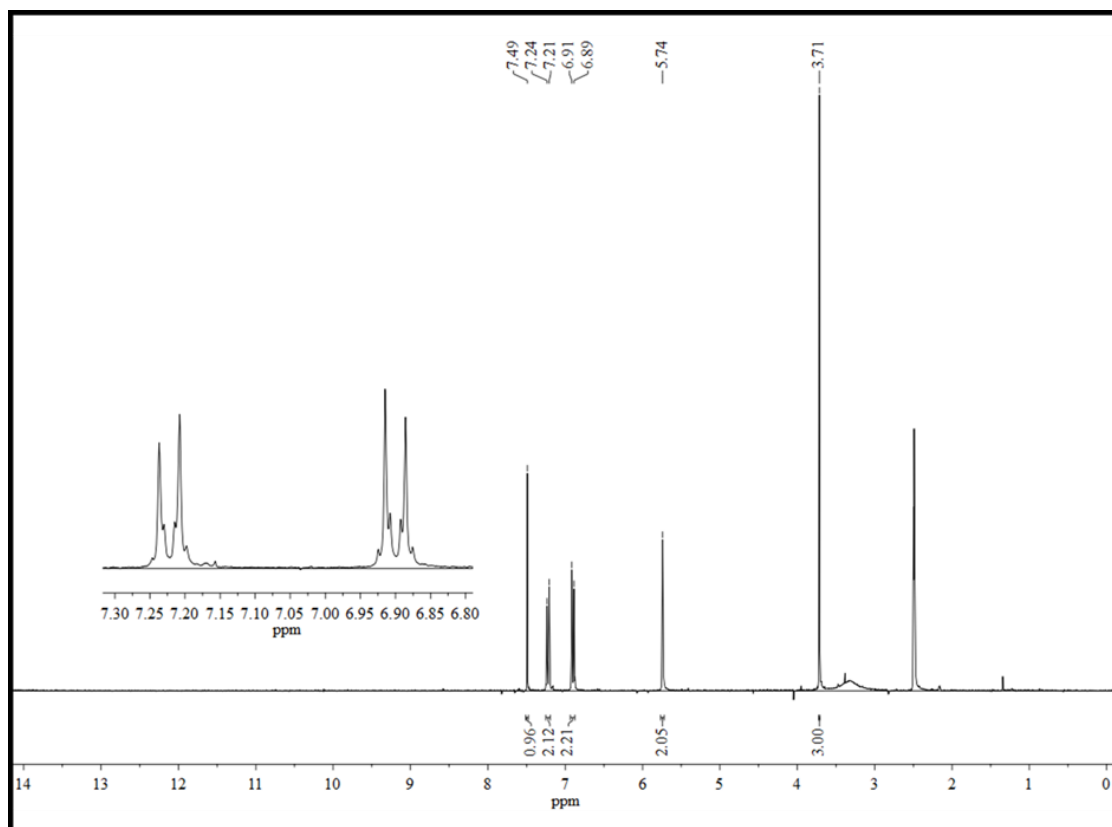
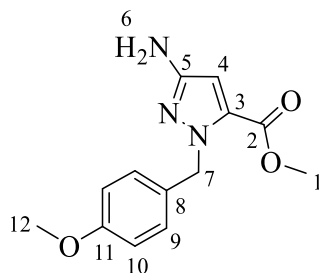


Abb. 176: ^1H -NMR-Spektrum von *N*-*p*-Methoxybenzyl-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carbonsäure 39 (300 MHz, DMSO-d_6).

Synthese von *N*-*p*-Methoxybenzyl-3-amino-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **40**

0.42 g *N*-*p*-Methoxybenzyl-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **38** (1,46 mmol, 1.0 äq.) wurden in 23 mL Methanol und 7 mL THF gelöst und mit einer katalytischen Menge Palladium auf Aktivkohle (10 mol%, ca. 30 mg) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 19 h bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wurde der Katalysator über Kieselgur von der Lösung getrennt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der gelb-bräunliche Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat (3:1) gereinigt.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.70 (s, 3H, H-1), 3.71 (s, 3H, H-12), 5.10 (s, 2H, H-7), 5.51 (s, 2H, NH₂), 6.71 (s, 1H, H-4), 6.86-6.89 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-9), 7.11-7.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-10).

Ausbeute:	0.35 g	91 %	(0.13 mmol)
Molare Masse:	261.11 g/mol		
Chemische Summenformel:	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₃		

R_f-Wert: 0.077 3:1 in Cyclohexan/Ethylacetat

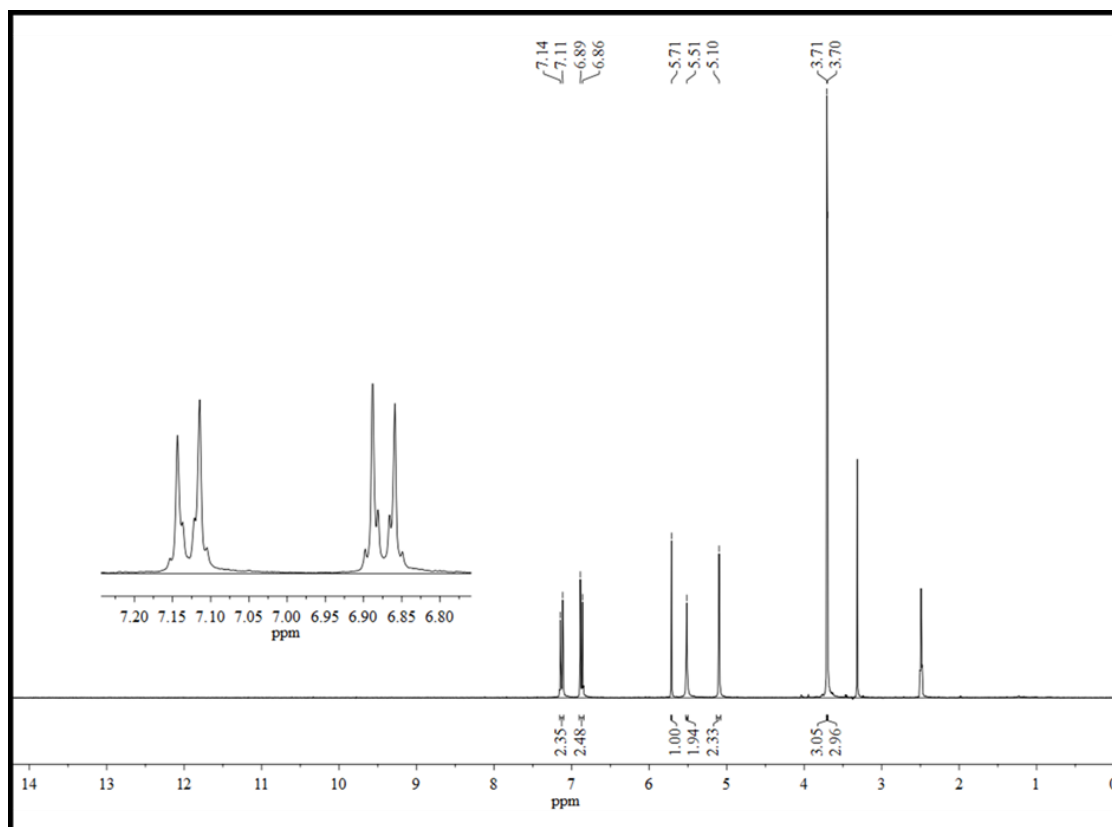
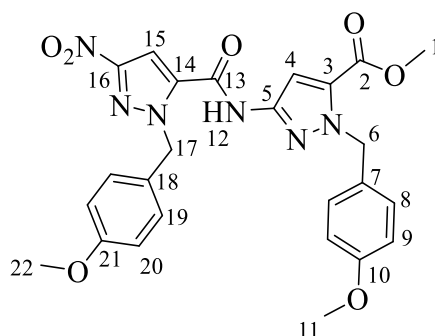


Abb. 177: ^1H -NMR-Spektrum von *N*-*p*-Methoxybenzyl-3-amino-1*H*-pyrazol-5-carboxymethylester 40 (300 MHz, DMSO-d_6).

Synthese von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carbox-amido)-1*H*-pyrazol-carbonsäuremethylester **41**



Unter Argonatmosphäre wurden 1.01 g *N*-*p*-Methoxybenzyl-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carbonsäure **39** (3.64 mmol, 1.1 äq) und 0.86 g *N*-*p*-Methoxybenzyl-3-amino-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **40** (3.31 mmol, 1.0 äq) in 75 mL absolutem Chloroform gelöst und zu der Lösung noch 3.62 g PyClop (8.60 mmol, 2.6 äq) hinzugegeben. Anschließend wurden langsam 4.5 mL DIPEA (26.47 mmol, 8.0 äq) zu der Reaktionslösung hinzugegeben und diese für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Reaktionsende wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat (3:1) gereinigt.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 3.76-3.78 (s, 6H, H-11, H-22), 3.91 (s, 3H, H-1), 5.61 (s, 2H, H-6), 5.80 (s, 2H, H-17), 6.81-6.85 (m, 4H, H-9, H-20), 7.21-7.22 (m, 2H, H-8), 7.25 (s, 1H, H-15), 7.34 (s, 1H, H-4), 7.36-7.39 (m, 2H, H-19), 8.24 (brs, 1H, H-12).

Ausbeute: 1.48 g 86 % (2.84 mmol)

Molare Masse: 520.49 g/mol

Chemische Summenformel: C₂₅H₂₄N₆O₇

R_f-Wert: 0.35 in 3:1 Cyclohexan/Ethylacetat

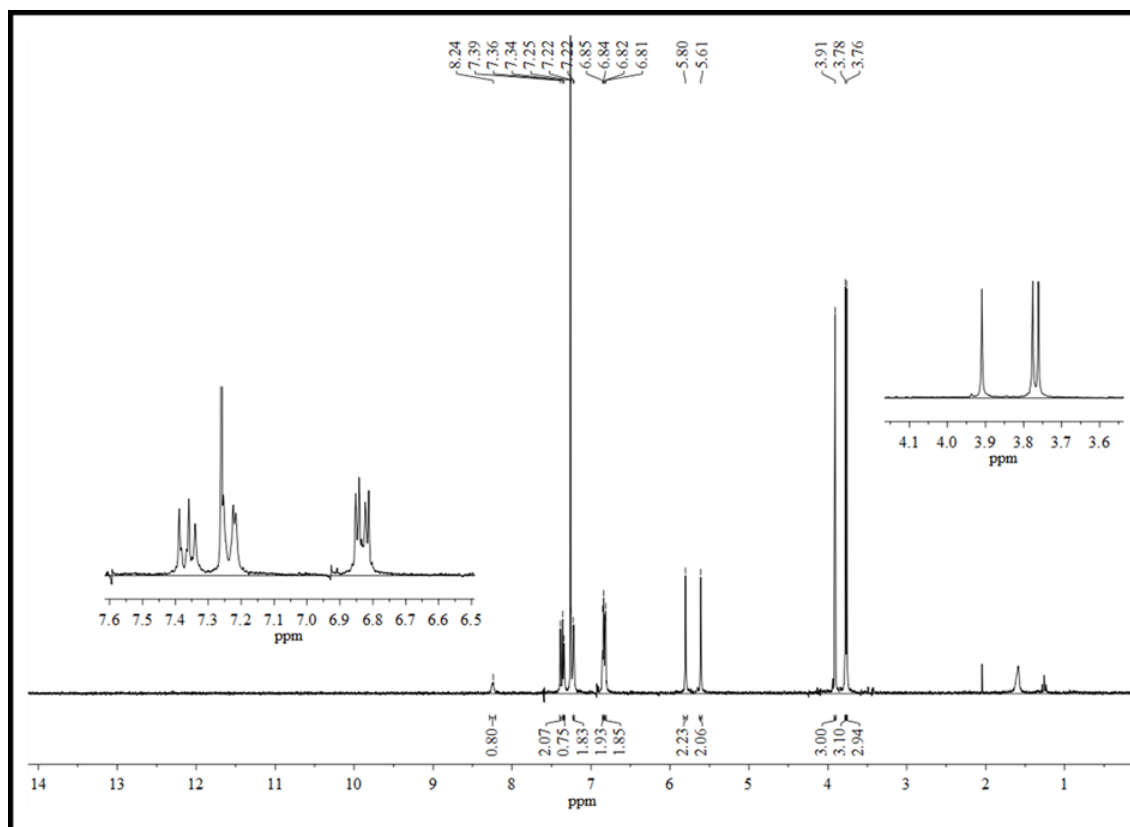
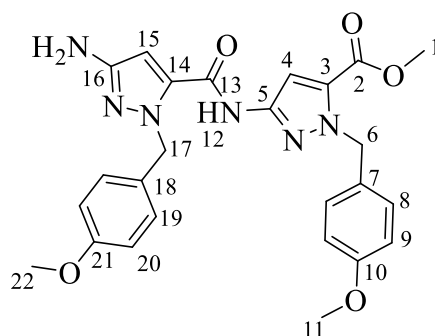


Abb. 178: ^1H -NMR-Spektrum von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-carbonsäuremethylester 41 (300 MHz, CDCl_3).

Synthese von 3-(3-Amino-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **42**

1.48 g 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-carbonsäuremethylester **41** (2.85 mmol, 1.0 äq.) wurden in 45 mL Methanol und 15 mL THF gelöst und mit einer katalytischen Menge Palladium auf Aktivkohle (10 mol%, ca. 50 mg) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 14 h bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wurde der Katalysator über Kieselgur von der Lösung getrennt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 3.74 (m, 3H, H-11), 3.75 (s, 3H, H-22), 3.87 (s, 3H, H-1), 5.51 (s, 2H, H-17), 5.59 (s, 2H, H-6), 6.04 (brs, 2H, NH₂-), 6.77-6.83 (m, 4H, H-9, H-20), 7.18-7.25 (m, 4H, H-8, H-19), 7.34 (s, 1H, H-4), 8.35 (brs, 1H, H-12).

MS (ESI): für C₂₅H₂₆N₆O₅Na ber.: 513,19; gef.: 513,22.

Ausbeute:	1.38 g	99 %	(2.81 mmol)
Molare Masse:	490.51 g/mol		
Chemische Summenformel:	C ₂₅ H ₂₆ N ₆ O ₅		

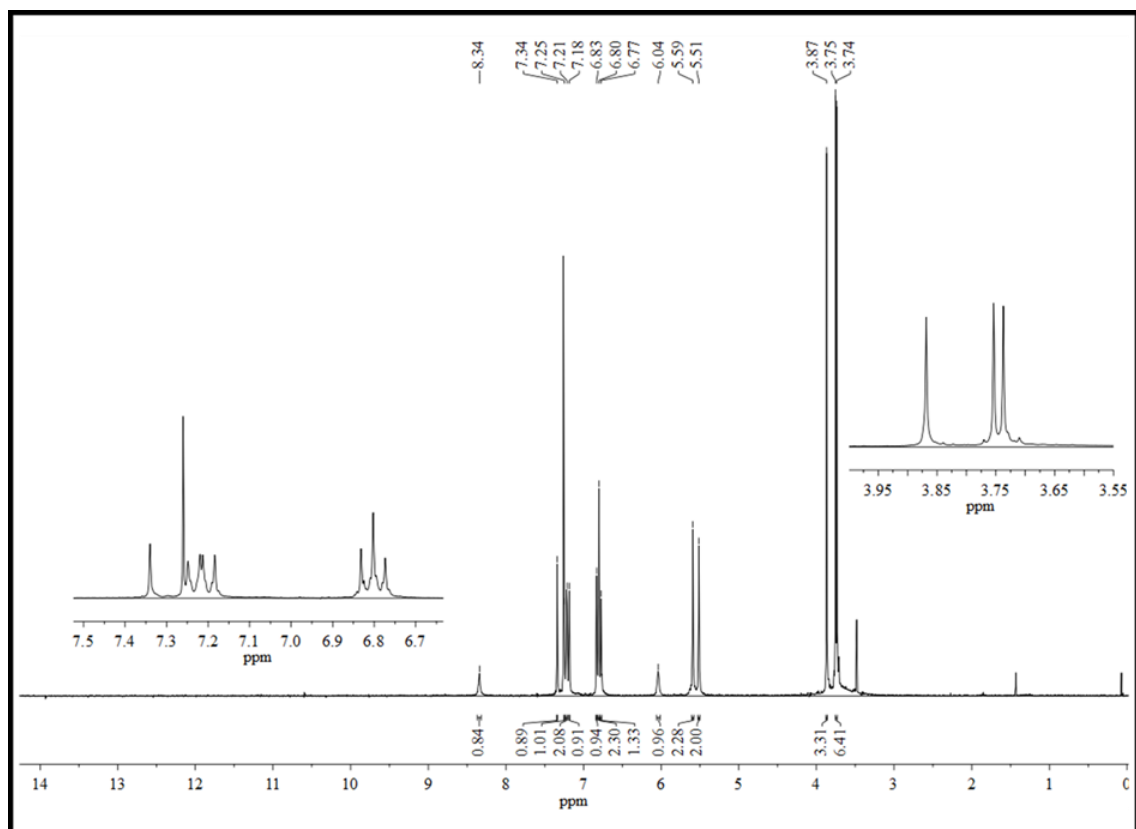
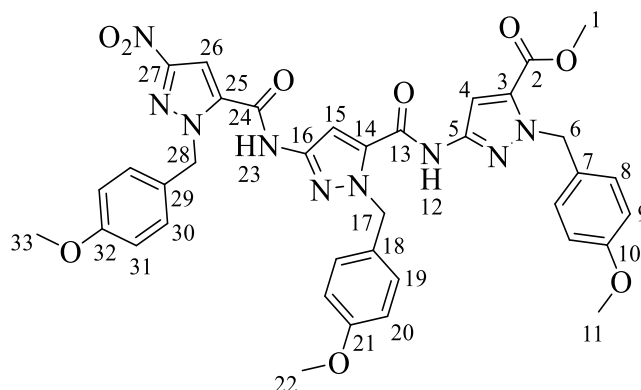


Abb. 179: ¹H-NMR-Spektrum von 3-(3-Amino-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester 42 (300 MHz, CDCl₃).

Synthese von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **43**



Unter Argon wurden 1.38 g 3-(3-Amino-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido) -1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **42** (2.81 mmol; 1.0 äq) und 0.91 g *N*-*p*-Methoxybenzyl-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carbonsäure **39** (3.29 mmol; 1.17 äq) in 150 mL abs. Chloroform gelöst. Zu der Reaktionslösung wurden 3.09 g PyClop (7.32 mmol; 2.6 äq) und tropfenweise 3.83 mL DIPEA (22.51 mmol; 8.0 äq.) hinzugegeben. Die Lösung wurde für 48 h zum Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt und das bräunliche Öl säulenchromatographisch an Kieselgel (3:1 Cyclohexan/Ethylacetat) gereinigt.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.70-3.72 (3s, 9H, H-11, H-22, H-33), 3.86 (s, 3H, H-1), 5.59 (s, 2H, CH₂ Benzyl), 5.66 (s, 2H, CH₂ Benzyl), 5.81 (s, 2H, CH₂ Benzyl), 6.86-6.91 (m, 6H, CH_{Arom.}), 7.17- 7.20 (m, 4H, CH_{Arom.}), 7.22 (s, 1H, CH_{Pyrazol}), 7.26-7.29 (m, 2H, CH_{Arom.}), 7.72 (s, 1H, CH_{Pyrazol}), 7.98 (s, 1H, CH_{Pyrazol}), 11.44 (s, 1H, NH_{Amid}), 11.52 (s, 1H, NH_{Amid}).

Ausbeute:	1.69 g	80 %	(2.25 mmol)
Molare Masse:	749.73 g/mol		
Chemische Summenformel:	C ₃₇ H ₃₅ N ₉ O ₉		

R_f-Wert: 0.2 in 3:1 Cyclohexan/Ethylacetat

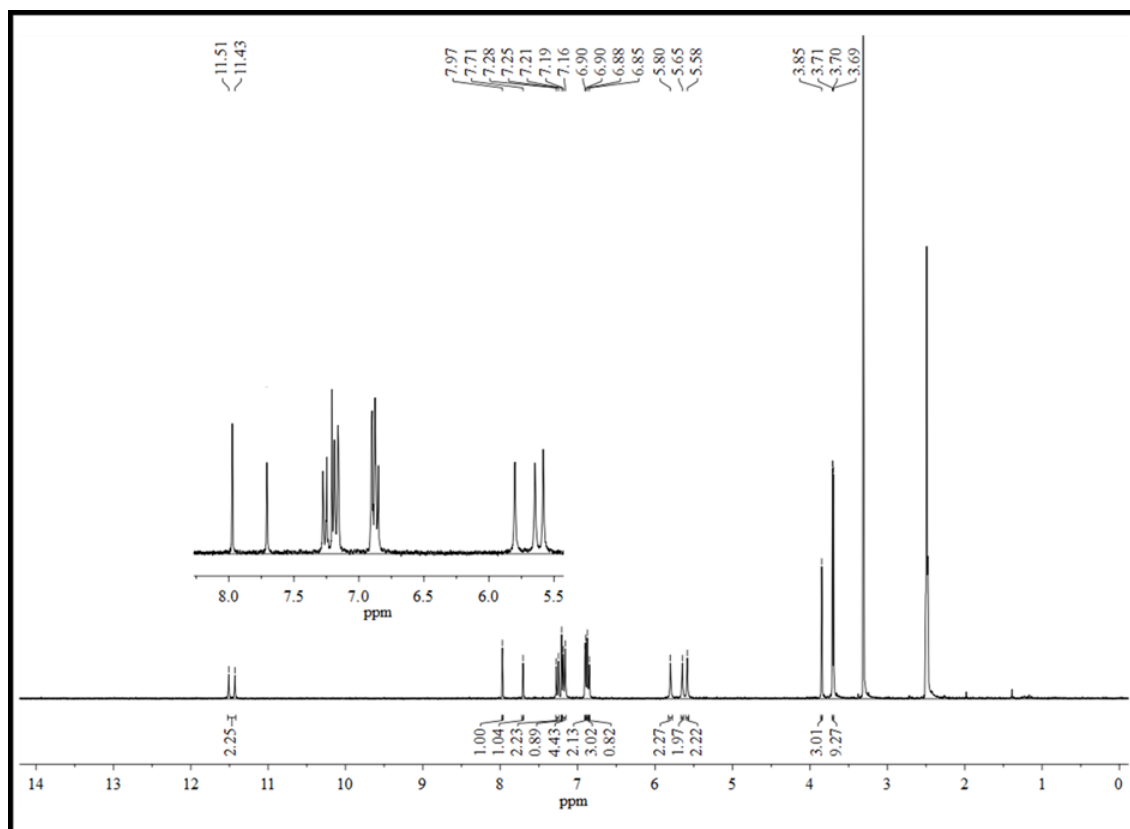
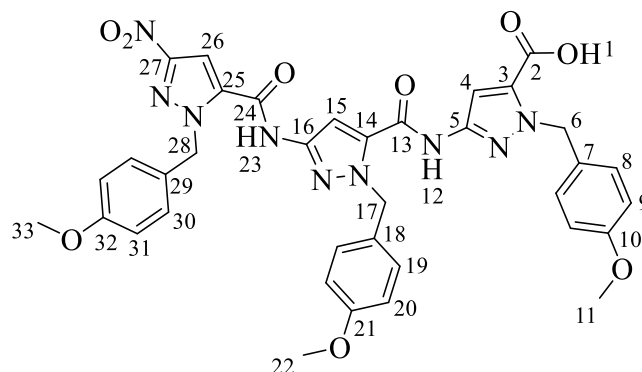


Abb. 180: ^1H -NMR-Spektrum von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester 43 (300 MHz, DMSO-d_6).

Synthese von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carbonsäure 44



In 10 mL THF und 5 mL Methanol wurde 0.101 g 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **43** (0,1338 mmol, 1.0 äq) gelöst und mit 0.03 g Lithiumhydroxid Monohydrat (0.67 mmol, 5.0 äq) und 1 mL bidest. Wasser versetzt. Die Reaktionslösung refluxierte über Nacht. Anschließend wurde das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in bidest. Wasser aufgenommen und mit 1 M Salzsäure auf pH = 1 angesäuert. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit Salzsäure gewaschen und anschließend getrocknet.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.69-3.71 (3s, 9H, H-11, H-22, H-33), 5.59 (s, 2H, CH₂ Benzyl), 5.65 (s, 2H, CH₂ Benzyl), 5.80 (s, 2H, CH₂ Benzyl), 6.85-6.90 (m, 6H, CH_{Arom.}), 7.14-7.17 (m, 4H, CH_{Arom.}), 7.19 (s, 1H, CH_{Pyrazol}), 7.25-7.28 (m, 2H, CH_{Arom.}), 7.70 (s, 1H, CH_{Pyrazol}), 7.97 (s, 1H, CH_{Pyrazol}), 11.37 (s, 1H, NH_{Amid}), 11.50 (s, 1H, NH_{Amid}).

Ausbeute:	0.09 g	100 %	(0.12 mmol)
Molare Masse:	735.70 g/mol		
Chemische Summenformel:	C ₃₆ H ₃₃ N ₉ O ₉		

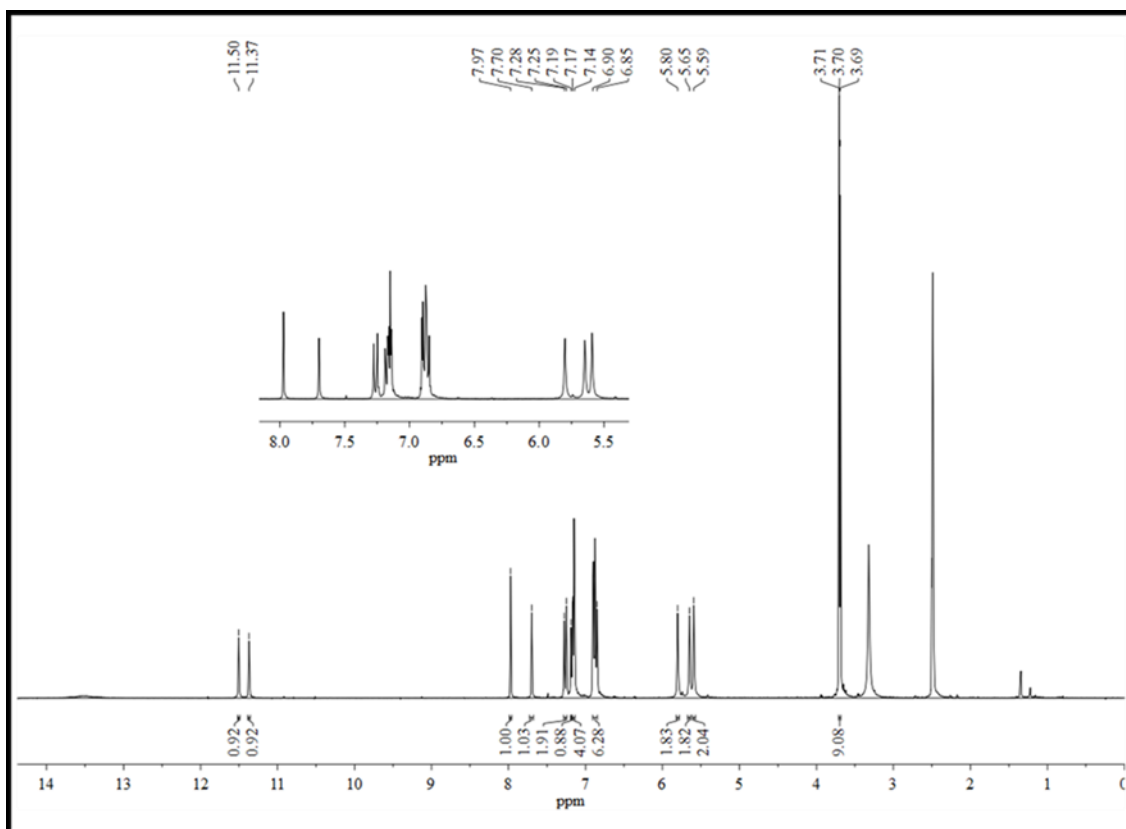
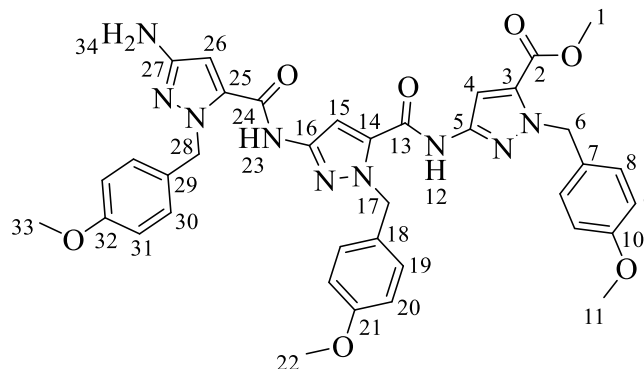


Abb. 181: ^1H -NMR-Spektrum von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäure 44 (300 MHz, DMSO-d_6).

Synthese von 3-(3-(3-Amino-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-5-carbonsäuremethylester 50



Es wurden 200 mg 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carbonsäuremethylester **43** (0.267 mmol; 1.0 äq) in einem Gemisch aus 15 mL THF und 5 mL Methanol gelöst und mit einer katalytischen Menge Palladium auf Aktivkohle (10 mol%, ca. 5 mg) versetzt. Die Lösung wurde für 24 h bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach einer DC-Kontrolle wurde der Katalysator über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 3.69-3.71 (3s, 9H, H-11, H-22, H-33), 3.84 (s, 3H, H-1), 4.82 (s, 2H, H-34), 5.43 (s, 2H, CH₂ Benzyl), 5.58 (s, 2H, CH₂ Benzyl), 5.62 (s, 2H, CH₂ Benzyl), 6.35 (s, 1H, CH_{Pyrazol}), 6.82-6.89 (m, 6H, CH_{Arom.}), 7.10-7.19 (m, 7H, CH_{Arom.}, CH_{Pyrazol}), 7.64 (s, 1H, CH_{Pyrazol}), 10.87 (s, 1H, NH_{Amid}), 11.36 (s, 1H, NH_{Amid}).

Ausbeute:	0.13 g	69 %	(2.8 mmol)
Molare Masse:	719.75 g/mol		
Chemische Summenformel:	C ₃₇ H ₃₇ N ₉ O ₇		

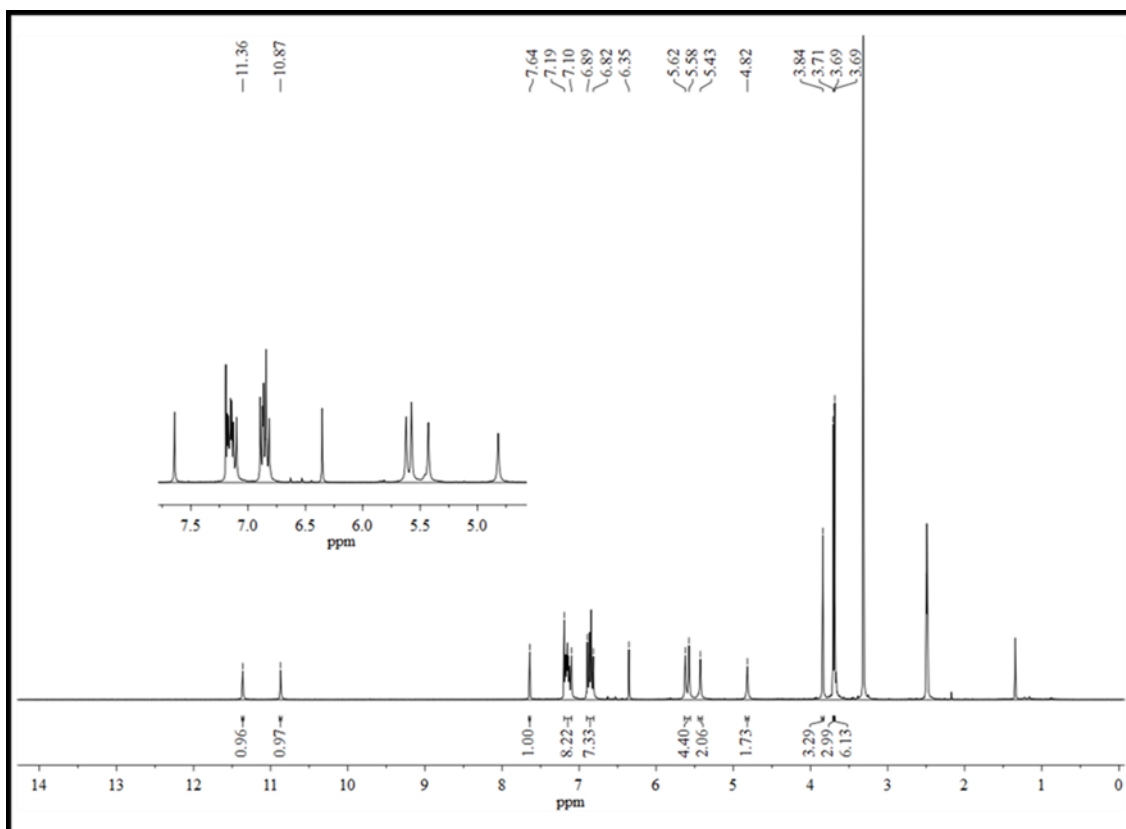


Abb. 182: ^1H -NMR-Spektrum von 3-(3-(3-Amino-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester 50 (300 MHz, CDCl_3).

5.3 Automatisierte Festphasenpeptidsynthese

Allgemeine Vorschrift I:

Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese wurde von *Heike Wöll* aus dem Arbeitskreis Schrader (Organische Chemie, Universität Duisburg-Essen) an einem Mikrowellen-Peptidsynthesizer (Liberty, *CEM GmbH*) durchgeführt. Es wurden Ansätze von 0.10 mmol hergestellt, wobei das eingesetzte Harz zu Beginn in 5 mL DMF für 5 Stunden unter Schütteln gequollen wurde.

Die verwendeten Lösungskonzentrationen waren wie folgt:

Fmoc-Aminosäure 0.20 M in DMF

Activator (HCTU) 0.50 M in DMF

Base (DIPEA) 2.00 M in NMP

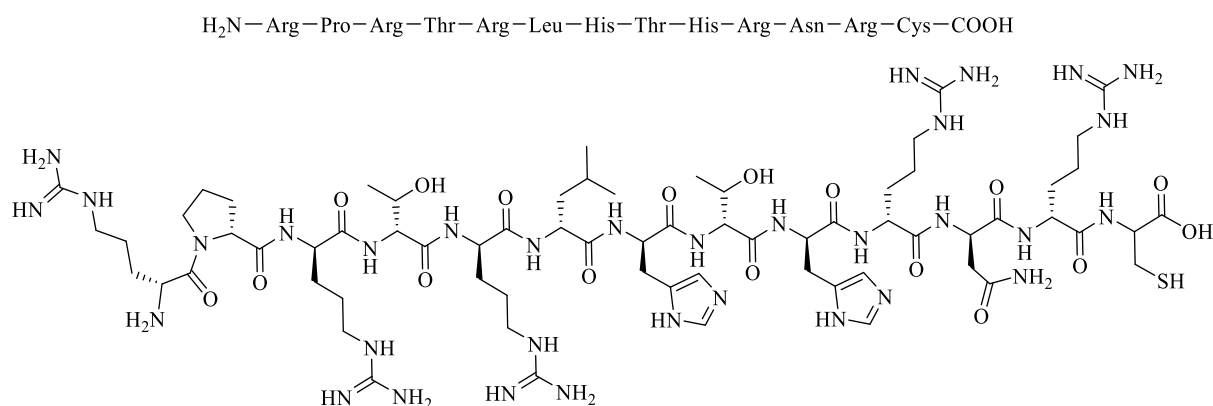
Deprotector (Piperidin) 20 % in DMF

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid am Harz mit Dichlormethan gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

Für eine Testabspaltung, bzw. vollständigen Abspaltung des Peptids vom Harz wurde dieses mit 93 % TFA, 5 % TIS und 2 % dest. Wasser versetzt und 5 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung mit freiem Peptid filtriert. Aus der klaren Lösung konnte mit gekühltem Diethylether das Peptid gefällt werden. Die Lösung wurde zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Peptid dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen. Nach Trocknung des Feststoffs wurde dieser in 0.1 % wässriger TFA gelöst und lyophilisiert.

Bei jedem hergestellten Ansatz wurde eine Testabspaltung durchgeführt, um die Vollständigkeit der Synthese (mittels Massenspektrometrie) und dessen Reinheit (mittels HPLC) zu überprüfen.

Synthese von (R)-Argininy-(R)-prolinyl-(R)-argininy-(R)-threoniny-(R)-argininy-(R)-leuciny-(R)-histidiny-(R)-threoniny-(R)-histidiny-(R)-argininy-(R)-asparaginy-(R)-arginyl-(S)-cystein **28 (D3_5+)**



Für die Herstellung des Peptids D3-Cys wurde ein mit Fmoc-Cys(Trt) vorbeladenes Wang-Harz verwendet. Das Harz hatte eine Beladungszahl von 0.57 mmol/g. Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift I:

Kupplungseinwaagen:

Fmoc-L-Cys(Trt)-Wang-Harz:	0.17 g (0.1 mmol, 1.0 äq)
Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH:	3.50 g in 27 mL DMF (Doppelkupplung)
Fmoc-D-Asn(Trt)-OH:	0.96 g in 8 mL DMF
Fmoc-D-His(Trt)-OH:	0.99 g in 8 mL DMF
Fmoc-D-Leu-OH:	0.57 g in 8 mL DMF (Doppelkupplung)
Fmoc-D-Pro-OH:	0.54 g in 8 mL DMF
Fmoc-D-Thr(tBu)-OH:	0.64 g in 8 mL DMF
HCTU:	5.17 g in 25 mL DMF
DIPEA:	7.0 mL in 13 mL NMP
Piperidin:	50 mL in 200 mL DMF
DMF:	2.41 L
DCM:	83 mL

Die Kupplung der Aminosäuren Fmoc-D-Leu-OH und Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH erfolgte durch eine Doppelkupplung und wurde für 300 s in der Mikrowelle durchgeführt.

Nach einer Totalabspaltung vom Harz konnte das Produkt **28** erhalten und mittels HPLC und LC-MS analysiert werden.

^1H -NMR (600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1)) δ [ppm] = 0.81- 0.89 (2d, 6H, 2CH_3), 1.13-1.14 (d, 3H, CH_3), 1.18-1.19 (d, 3H, CH_3), 1.30-2.07 (m, 32H, CH_2), 2.33-2.39 (m, 1H, CH_2), 2.75-2.82 (m, 2H, CH_2), 2.96-3.05 (m, 2H, CH_2), 3.18-3.34 (m, 16H, CH_2), 3.41-3.44 (m, 1H, CH_2), 3.52-3.63 (m, 2H, CH_2), 3.75-3.79 (m, 1H, CH_2), 4.14-4.16 (m, 2H, CH), 4.26-4.40 (m, 5H, CH), 7.27-7.33 (m, 7H, NH, NH_2), 8.25-8.29 (m, 2H, NH), 8.34-8.35 (m, 1H, NH), 8.45-8.48 (m, 2H, NH), 8.54-8.55 (m, 1H, NH), 8.62-8.71 (m, 5H, NH).

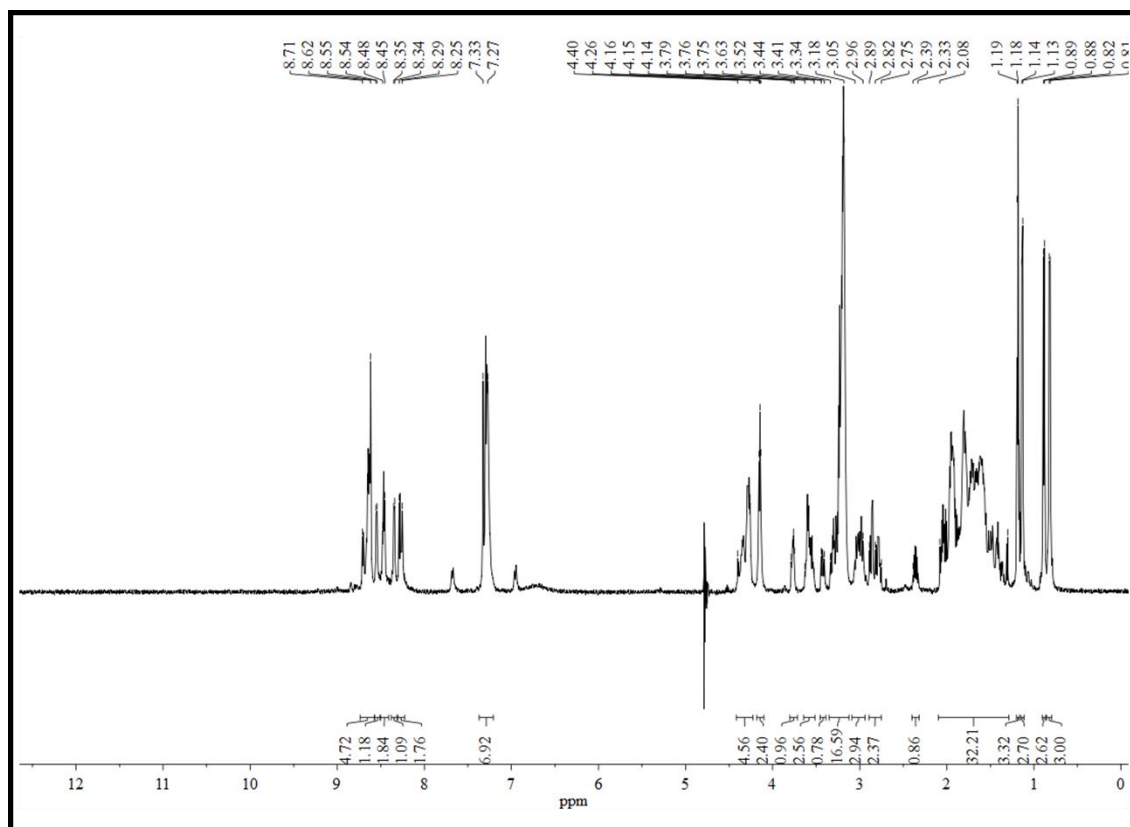
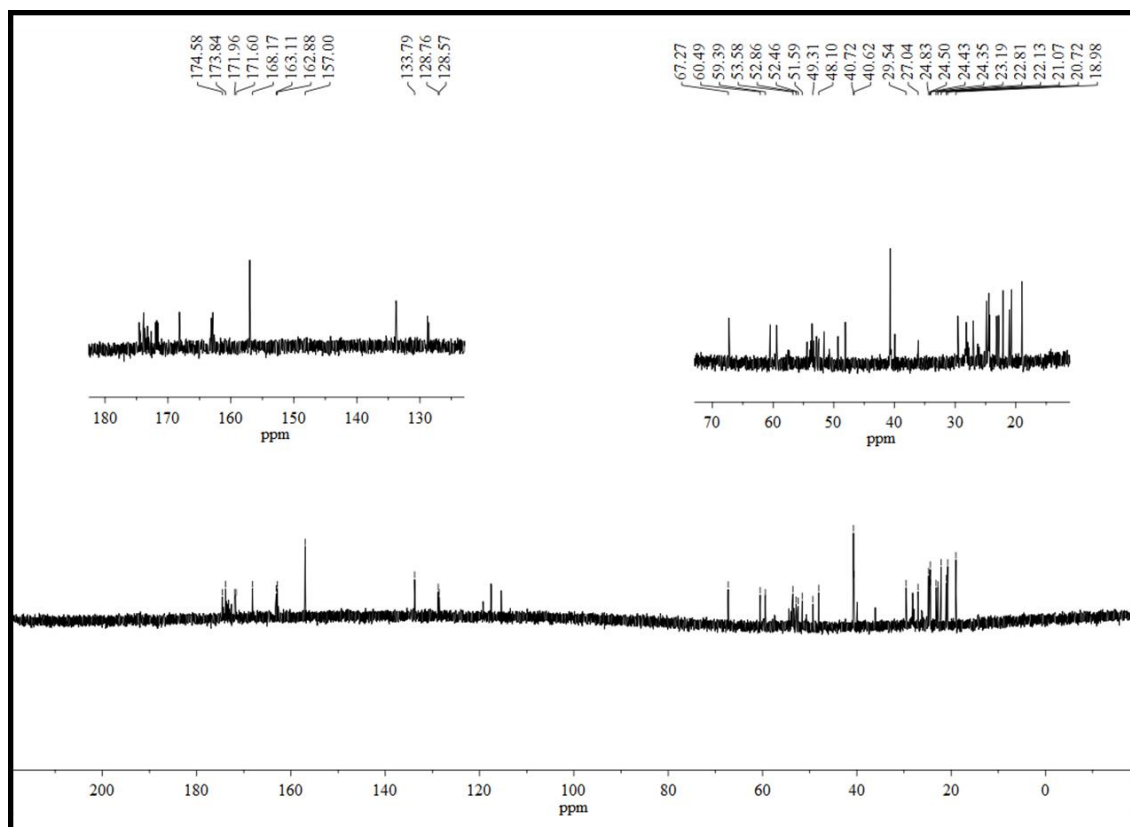
^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1)) δ [ppm] = 18.98, 20.72, 21.07, 22.13, 22.81, 23.19, 24.35, 24.43, 24.50, 24.83, 27.04, 29.54, 40.62, 40.72, 48.10, 49.31, 51.59, 52.46, 52.86, 53.58, 59.39, 60.49, 67.27, 128.57, 128.76, 133.79, 157.00, 162.88, 163.11, 168.17, 171.60, 171.96, 173.84, 174.58.

MS (ESI): $[\text{M}+3\text{H}]^{3+} = m/z$ ber. für $\text{C}_{68}\text{H}_{117}\text{N}_{33}\text{O}_{17}\text{SNa}_2$: 583.31, gef.: 585.65; $[\text{M}+4\text{H}]^{4+} = m/z$ ber. für $\text{C}_{68}\text{H}_{117}\text{N}_{33}\text{O}_{17}\text{SNa}_2$: 438.24, gef: 439.52; $[\text{M}+5\text{H}]^{5+} = m/z$ ber. für $\text{C}_{68}\text{H}_{117}\text{N}_{33}\text{O}_{17}\text{SNa}_2$: 350.79, gef: 351.91; $[\text{M}+6\text{H}]^{6+} = m/z$ ber. für $\text{C}_{68}\text{H}_{117}\text{N}_{33}\text{O}_{17}\text{SNa}_2$: 292.50, gef: 293.53.

HPLC-Reinheit: 98.1 % (RP 18 Säule, 214 nm, Flussrate 0.5 mL/min, Retentionszeit: 14.2 min, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min, Eluent A: Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Molare Masse: 1702.95 g/mol

Chemische Summenformel: $\text{C}_{68}\text{H}_{119}\text{N}_{33}\text{O}_{17}\text{S}$ (Monomer)

Abb. 183: ¹H-NMR-Spektrum von D3_5+ 28 (600 MHz, H₂O/D₂O 9:1).Abb. 184: ¹³C-NMR-Spektrum von D3_5+ 28 (125 MHz, H₂O/D₂O 9:1).

Tab. 14: Chemische Verschiebung der ^1H -NMR-Signale von D3_5+.^[179]

D3-Cys	HN	H $^{\alpha}$	H $^{\beta}$	H $^{\gamma}$	H $^{\delta}$	H $^{\epsilon}$
Arg1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pro2	-	4.518	2.361	2.027	3.592/3.764	-
Arg3	8.640	4.363	1.863/1.801	1.672	n.d.	n.d.
Thr4	8.284	4.292	4.141	1.187	-	-
Arg5	8.460	4.337	1.826/1.728	1.591	3.176	n.d.
Leu6	8.348	4.266	1.552	1.408	0.887/0.808	-
His7	8.649	4.797	3.287/3.173	-	n.d.	n.d.
Thr8	8.260	4.260	4.141	1.128	-	-
His9	8.707	4.743	3.320/3.210	-	n.d.	n.d.
Arg10	8.548	4.286	1.808/1.778	1.617	3.176	n.d.
Asn11	8.658	4.683	2.785/2.851	-	n.d.	-
Arg12	8.476	4.342	1.929/1.813	1.650	3.182	n.d.
Cys13	8.635	4.840	3.215	-	-	-

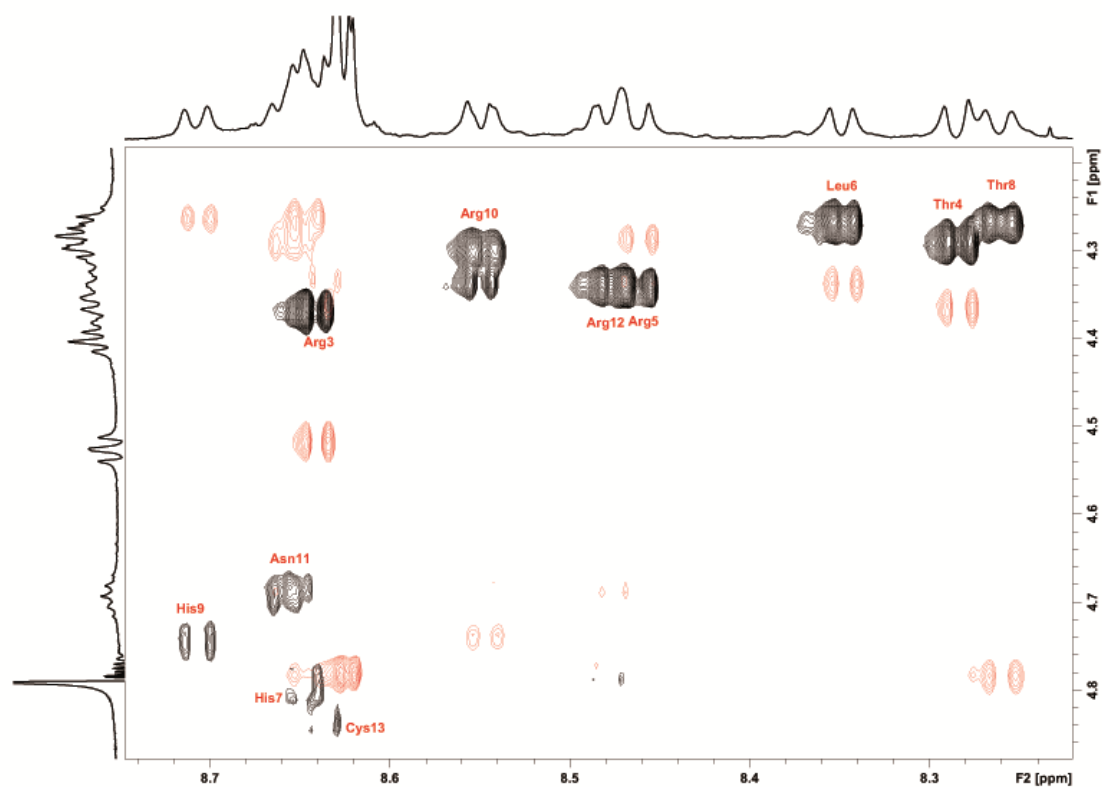
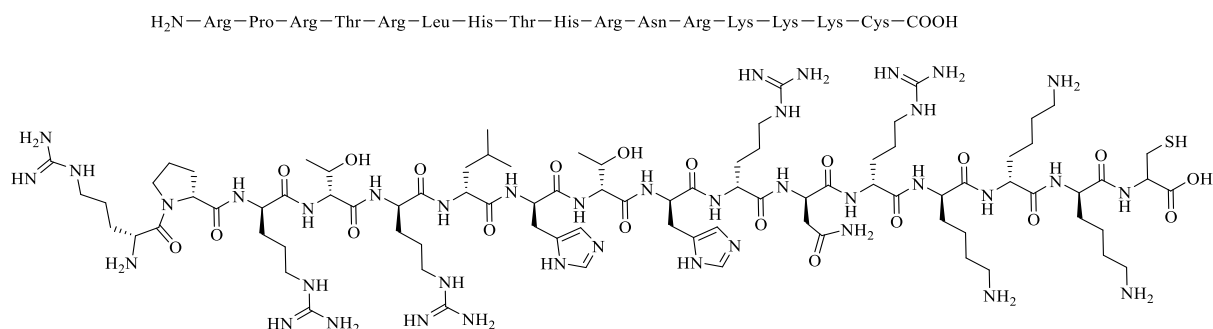


Abb. 185: 2D-NOESY-NMR-Spektrum von D3_5+ (28).^[179]

Synthese von (R)-Argininy-(R)-prolinyl-(R)-argininy-(R)-threoniny-(R)-argininy-(R)-leuciny-(R)-histidiny-(R)-threoniny-(R)-histidiny-(R)-argininy-(R)-asparaginy-(R)-arginyl-(S)-lysiny-(S)-lysiny-(S)-lysiny-(S)-cystein **29 (D3_8+)**



Für die Herstellung des Peptids D3-(Lys)₃-Cys wurde ein mit Fmoc-Cys(Trt) vorbeladenes Wang-Harz verwendet. Das Harz hatte eine Beladungszahl von 0.57 mmol/g. Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift I:

Kupplungseinwaagen:

Fmoc-L-Cys(Trt)-Wang-Harz:	0.17 g (0.1 mmol, 1.0 äq)
Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH:	3.50 g in 27 mL DMF (Doppelkupplung)
Fmoc-D-Asn(Trt)-OH:	0.96 g in 8 mL DMF
Fmoc-D-His(Trt)-OH:	0.99 g in 8 mL DMF
Fmoc-D-Leu-OH:	0.57 g in 8 mL DMF (Doppelkupplung)
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH:	0.94 g in 10 mL DMF
Fmoc-D-Pro-OH:	0.54 g in 8 mL DMF
Fmoc-D-Thr(tBu)-OH:	0.64 g in 8 mL DMF
HCTU:	6.21 g in 30 mL DMF
DIPEA:	7.0 mL in 13 mL NMP
Piperidin:	60 mL in 240 mL DMF
DMF:	2.9 L
DCM:	83 mL

Die Kupplung der Aminosäuren Fmoc-D-Leu-OH und Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH erfolgte durch eine Doppelkupplung und wurde für 300 s in der Mikrowelle durchgeführt.

Nach einer Totalabspaltung vom Harz konnte das Produkt **29** erhalten und mittels HPLC und LC-MS analysiert werden.

¹H-NMR (600 MHz, H₂O/D₂O (9:1)) δ [ppm] = 0.82- 0.89 (2d, 6H, 2CH₃), 1.13-1.14 (d, 3H, CH₃), 1.18-1.20 (d, 3H, CH₃), 2.33-2.39 (m, 2H, CH₂), 2.78-2.83 (m, 3H, CH₂), 3.00 (s, 10H, CH₂), 3.18-3.40 (m, 21H, CH₂), 3.50-3.67 (m, 7H, CH₂), 3.75-3.79 (m, 2H, CH₂), 4.11-4.16 (m, 4H, CH₂), 4.26-4.41 (m, 16H, CH₂), 4.51-4.54 (t, 2H, CH₂), 7.27-7.33 (m, 7H, NH, NH₂), 7.53 (bs, 4H, NH₂), 7.71 (s, 2H, NH₂), 8.27-8.29 (m, 2H, NH), 8.33-8.37 (m, 3H, NH), 8.41-8.42 (m, 1H, NH), 8.46-8.55 (m, 4H, NH), 8.62-8.76 (m, 7H, NH).

¹³C-NMR (125 MHz, H₂O/D₂O (9:1)) δ [ppm] = 18.98, 20.72, 21.06, 22.13, 22.19, 22.85, 23.20, 24.35, 24.45, 24.50, 24.83, 26.49, 27.05, 28.16, 29.55, 39.52, 40.62, 40.73, 48.10, 51.60, 52.44, 53.59, 53.85, 53.96, 59.36, 60.48, 67.22, 128.79, 133.80, 157.01, 168.17, 171.57, 171.82, 171.99, 173.22, 173.83, 173.93, 174.56.

MS (ESI): [M+5H]⁵⁺ = m/z ber. für C₈₆H₁₄₈N₃₉O₂₀SN_{a7}: 448.26, gef.: 448.18; [M+5H]⁵⁺ = m/z ber. für C₈₆H₁₅₃N₃₉O₂₀SN_{a2}: 426.29, gef.: 426.74; [M+6H]⁶⁺ = m/z ber. für C₈₆H₁₅₂N₃₉O₂₀SN_{a3}: 358.69, gef.: 357.50.

HPLC-Reinheit: 99.1 % (RP 18 Säule, 214 nm, Flussrate 0.5 mL/min, Retentionszeit: 14.0 min, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min, Eluent A: Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Molare Masse: 2087.47 g/mol

Chemische Summenformel: C₈₆H₁₅₅N₃₉O₂₀S (Monomer)

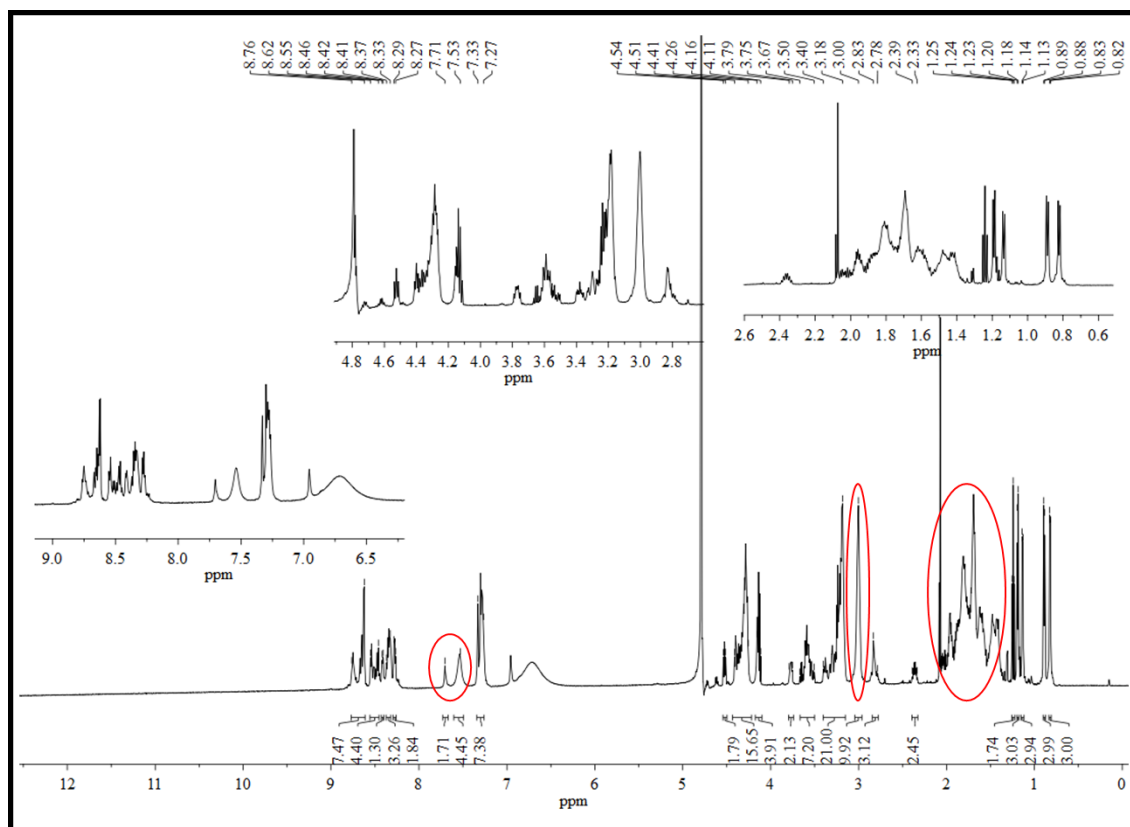


Abb. 186: ¹H-NMR-Spektrum von D3_8+ 29 (600 MHz, H₂O/D₂O 9:1). Veränderungen im NMR-Spektrum durch den (Lys)₃-Spacer sind rot markiert.

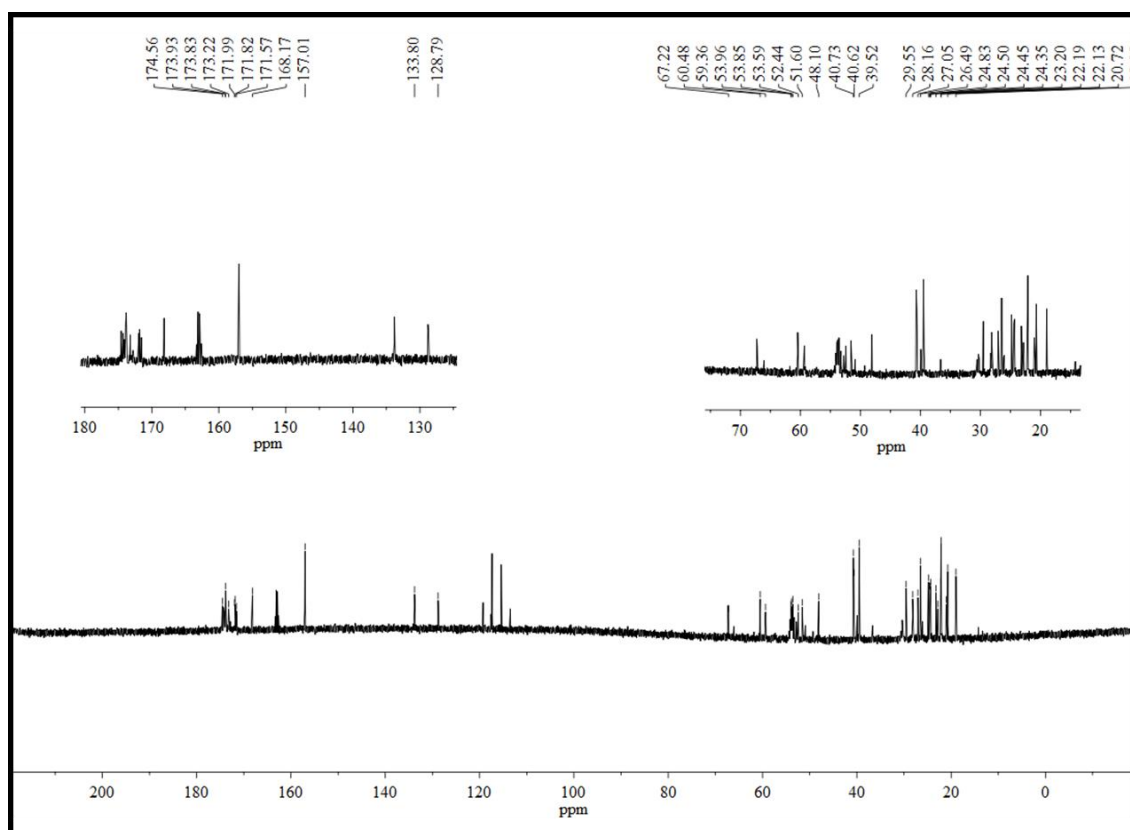
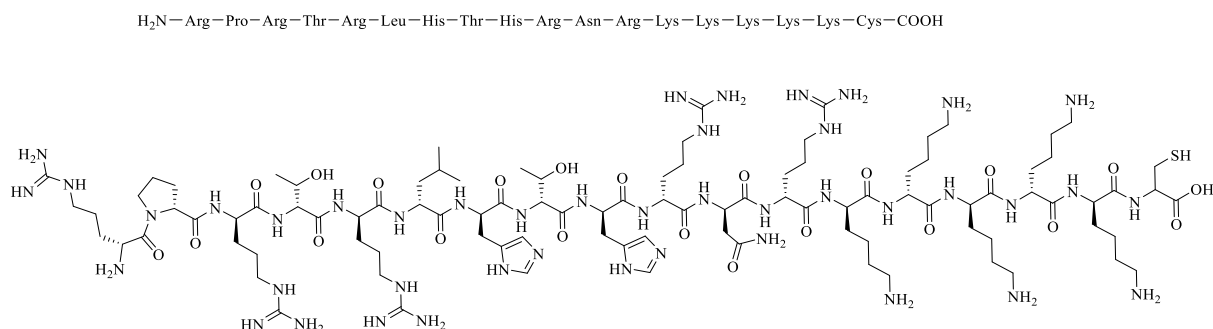


Abb. 187: ¹³C-NMR-Spektrum von D3_8+ 29 (125 MHz, H₂O/D₂O 9:1).

Synthese von (R)-Argininy-(R)-prolinyl-(R)-argininy-(R)-threoniny-(R)-argininy-(R)-leuciny-(R)-histidiny-(R)-threoniny-(R)-histidiny-(R)-argininy-(R)-asparaginy-(R)-argininy-(S)-lysiny-(S)-lysiny-(S)-lysiny-(S)-lysiny-(S)-lysiny-(S)-cystein 30 (D3_10+)



Für die Herstellung des Peptids D3-(Lys)₅-Cys wurde ein mit Fmoc-Cys(Trt) vorbeladenes Wang-Harz verwendet. Das Harz hatte eine Beladungszahl von 0.57 mmol/g. Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift I:

Kupplungseinwaagen:

Fmoc-L-Cys(Trt)-Wang-Harz:	0.17 g (0.1 mmol, 1.0 äq)
Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH:	3.76 g in 29 mL DMF (Doppelkupplung)
Fmoc-D-Asn(Trt)-OH:	0.96 g in 8 mL DMF
Fmoc-D-His(Trt)-OH:	0.99 g in 8 mL DMF
Fmoc-D-Leu-OH:	0.57 g in 8 mL DMF (Doppelkupplung)
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH:	1.50 g in 16 mL DMF
Fmoc-D-Pro-OH:	0.54 g in 8 mL DMF
Fmoc-D-Thr(tBu)-OH:	0.64 g in 8 mL DMF
HCTU:	6.21 g in 30 mL DMF
DIPEA:	7.0 mL in 13 mL NMP
Piperidin:	70 mL in 280 mL DMF
DMF:	3.3 L
DCM:	83 mL

Die Kupplung der Aminosäuren Fmoc-D-Leu-OH und Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH erfolgte durch eine Doppelkupplung und wurde für 300 s in der Mikrowelle durchgeführt.

Nach einer Totalabspaltung vom Harz konnte das Produkt **30** erhalten und mittels HPLC und LC-MS analysiert werden.

^1H -NMR (600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1)) δ [ppm] = 0.82- 0.89 (2d, 6H, 2CH_3), 1.13-1.16 (d, 3H, CH_3), 1.17-1.19 (d, 3H, CH_3), 2.33-2.39 (m, 2H, CH_2), 2.75-2.86 (m, 4H, CH_2), 3.00 (s, 12H, CH_2), 3.18-3.40 (m, 18H, CH_2), 3.51-3.61 (m, 6H, CH_2), 3.75-3.79 (m, 2H, CH_2), 4.13-4.15 (m, 2H, CH), 4.28-4.41 (m, 15H, CH), 7.25-7.32 (m, 7H, NH, NH_2), 7.55-7.69 (bs, 10H, NH_2), 8.25-8.27 (m, 2H, NH), 8.33-8.34 (m, 2H, NH), 8.39-8.47 (m, 5H, NH), 8.52-8.72 (m, 9H, NH).

^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1)) δ [ppm] = 18.95, 20.72, 21.04, 22.12, 22.19, 23.21, 24.35, 24.50, 24.82, 26.45, 27.03, 28.16, 29.55, 30.62, 39.41, 39.51, 40.61, 40.72, 48.10, 53.62, 59.33, 60.47, 66.08, 67.28, 128.53, 128.72, 133.72, 133.78, 156.95, 162.63, 162.86, 163.10, 163.33, 168.15, 171.93, 173.83, 174.44.

MS (ESI): $[\text{M}+5\text{H}]^{5+} = m/z$ ber. für $\text{C}_{98}\text{H}_{172}\text{N}_{43}\text{O}_{22}\text{SNa}_7$: 499.53, gef.: 499.43; $[\text{M}+5\text{H}]^{5+} = m/z$ ber. für $\text{C}_{98}\text{H}_{177}\text{N}_{43}\text{O}_{22}\text{SNa}_2$: 478.56, gef.: 479.96; $[\text{M}+6\text{H}]^{6+} = m/z$ ber. für $\text{C}_{98}\text{H}_{172}\text{N}_{43}\text{O}_{22}\text{SNa}_7$: 416.28, gef.: 416.33; $[\text{M}+6\text{H}]^{6+} = m/z$ ber. für $\text{C}_{98}\text{H}_{176}\text{N}_{43}\text{O}_{22}\text{SNa}_3$: 401.38, gef.: 400.23; $[\text{M}+7\text{H}]^{7+} = m/z$ ber. für $\text{C}_{98}\text{H}_{176}\text{N}_{43}\text{O}_{22}\text{SNa}_3$: 344.25; gef: 343.24.

HPLC-Reinheit: 98.8 % (RP 18 Säule, 214 nm, Flussrate 0.5 mL/min, Retentionszeit: 13.9 min, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min, Eluent A: Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Molare Masse: 2343.85 g/mol

Chemische Summenformel: $\text{C}_{98}\text{H}_{179}\text{N}_{43}\text{O}_{22}\text{S}$ (Monomer)

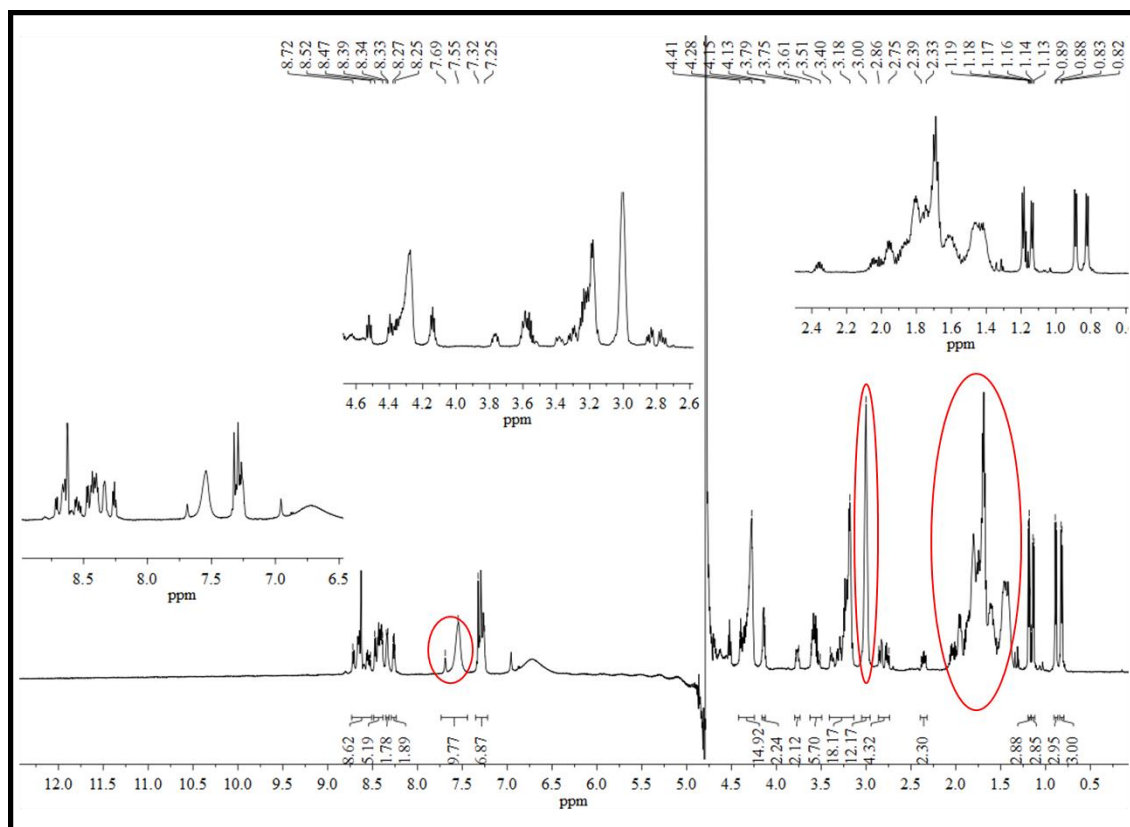


Abb. 188: ¹H-NMR-Spektrum von D3_10+ 30 (600 MHz, H₂O/D₂O 9:1). Veränderungen im NMR-Spektrum durch den (Lys) ϵ -Spacer sind rot markiert.

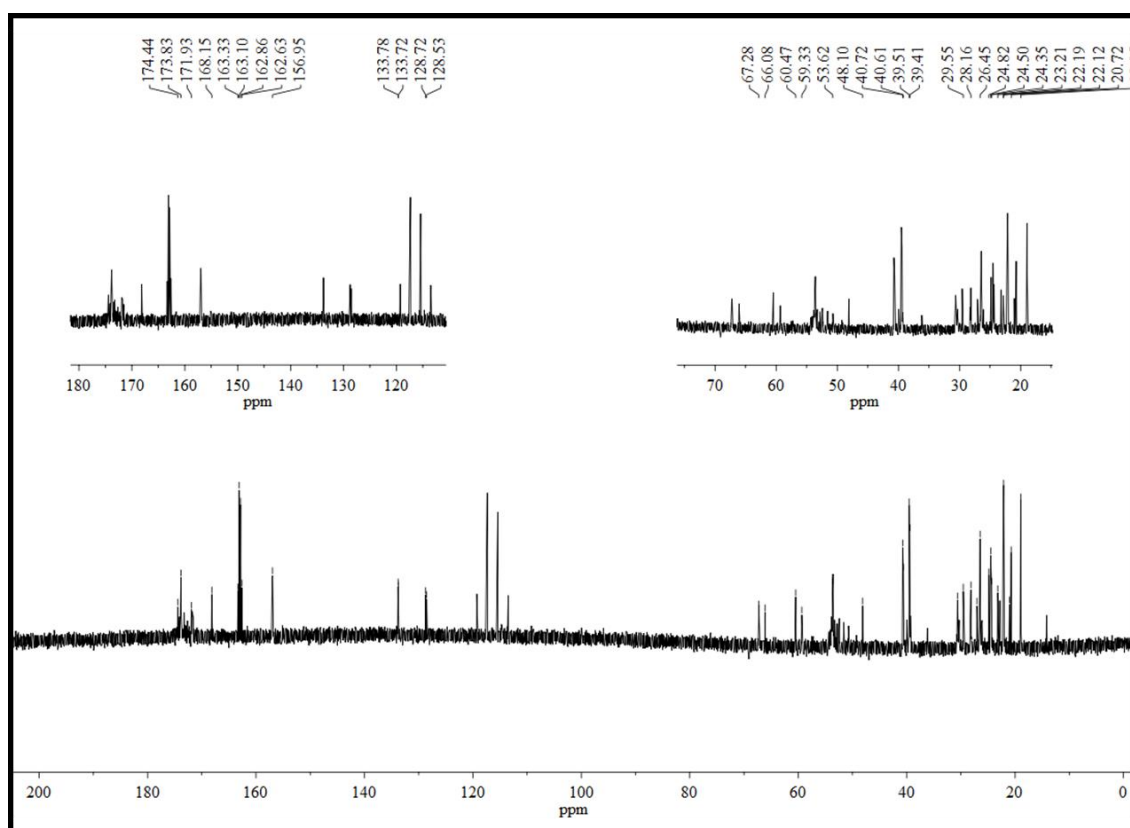
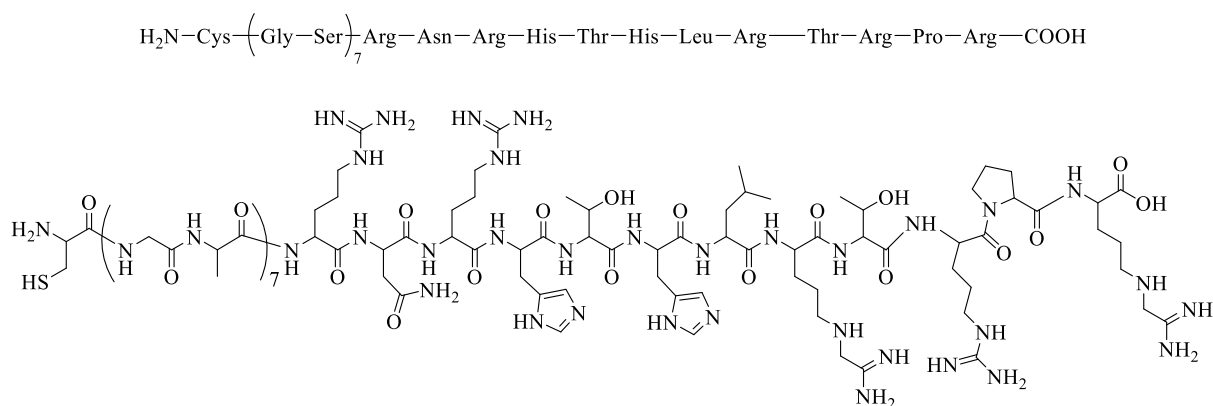


Abb. 189: ¹³C-NMR-Spektrum von D3_10+ 30 (125 MHz, H₂O/D₂O 9:1).

Synthese von (S)-Cysteinyl-(S)-glycyl-(S)-serinyl-(S)-glycyl-(S)-serinyl-(S)-glycyl-(S)-serinyl-(S)-glycyl-(S)-serinyl-(S)-glycyl-(S)-serinyl-(S)-glycyl-(S)-serinyl-(S)-glycyl-(S)-serinyl-(R)-argininyl-(R)-asparaginyl-(R)-argininyl-(R)-histidinyl-(R)-threoninyl-(R)-histidinyl-(R)-leucinyl-(R)-argininyl-(R)-threoninyl-(R)-argininyl-(R)-prolinyl-(R)-argin 49 (D3-(SG)7C)



Für die Herstellung des Peptids D3-(SG)₇-Cys wurde ein mit Fmoc-Arg(Pbf) vorbeladenes Wang-Harz verwendet. Das Harz hatte eine Beladungszahl von 0.71 mmol/g. Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift I:

Kupplungseinwaagen:

Fmoc-D-Arg(Pbf)-Wang-Harz:	0.14 g (0.1 mmol, 1.0 äq)
Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH:	3.24 g in 25 mL DMF (Doppelkupplung)
Fmoc-D-Asn(Trt)-OH:	0.72 g in 6 mL DMF
Fmoc-L-Cys(Trt)-OH:	0.70 g in 6 mL DMF
Fmoc-L-Gly-OH:	1.37 g in 23 mL DMF
Fmoc-D-His(Trt)-OH:	0.87 g in 7 mL DMF
Fmoc-D-Leu-OH:	0.50 g in 7 mL DMF (Doppelkupplung)
Fmoc-D-Pro-OH:	0.41 g in 6 mL DMF
Fmoc-L-Ser(tBu)-OH:	1.76 g in 23 mL DMF
Fmoc-D-Thr(tBu)-OH:	0.56 g in 6 mL DMF
HCTU:	8.27 g in 40 mL DMF
DIPEA:	7.7 mL in 14.3 mL NMP
Piperidin:	90 mL in 360 mL DMF
DMF:	4.8 L
DCM:	83 mL

Die Kupplung der Aminosäuren Fmoc-D-Leu-OH und Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH erfolgte durch eine Doppelkupplung und wurde für 300 s in der Mikrowelle durchgeführt.

Nach einer Totalabspaltung vom Harz konnte das Produkt **49** erhalten und mittels HPLC und LC-MS analysiert werden.

¹H-NMR (600 MHz, H₂O/D₂O (9:1)) δ [ppm] = 0.82- 0.89 (2d, 6H, 2CH₃), 1.13-1.19 (2d, 6H, CH₃), 1.33-1.92 (m, 26H, CH₂), 2.00-2.08 (m, 2H, CH₂), 2.29-2.33 (m, 1H, CH₂), 2.76-2.85 (m, 2H, CH₂), 3.10-3.30 (m, 16H, CH₂), 3.54-3.62 (m, 2H, CH₂), 3.85-4.16 (m, 28H, CH,CH₂), 4.30-4.48 (m, 5H, CH), 7.20-7.32 (m, 7H, NH, NH₂), 8.17-8.82 (m, 21H, NH).

¹³C-NMR (125 MHz, H₂O/D₂O (9:1)) δ [ppm] = 18.95, 20.72, 22.13, 24.20, 24.45, 27.48, 27.85, 28.11, 29.51, 40.72, 42.78, 55.95, 61.27, 66.09, 67.25, 128.45, 128.73, 133.78, 156.89, 157.00, 162.62, 162.86, 163.09, 163.33, 171.62, 171.82, 172.62, 173.25, 174.34, 175.32.

MS (ESI): [M+4H]⁴⁺ = m/z ber. für C₁₀₅H₁₇₈N₄₇O₃₈SKNa: 746.37, gef.: 747.33; [M+6H]⁶⁺ = m/z ber. für C₁₀₅H₁₇₈N₄₇O₃₈SNa: 461.32, gef.: 461.50.

HPLC-Reinheit: 66.8 % (RP 18 Säule, 214 nm, Flussrate 0.5 mL/min, Retentionszeit: 13.7 min, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min, Eluent A: Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Molare Masse: 2739.94 g/mol

Chemische Summenformel: C₁₀₅H₁₇₉N₄₇O₃₈S (Monomer)

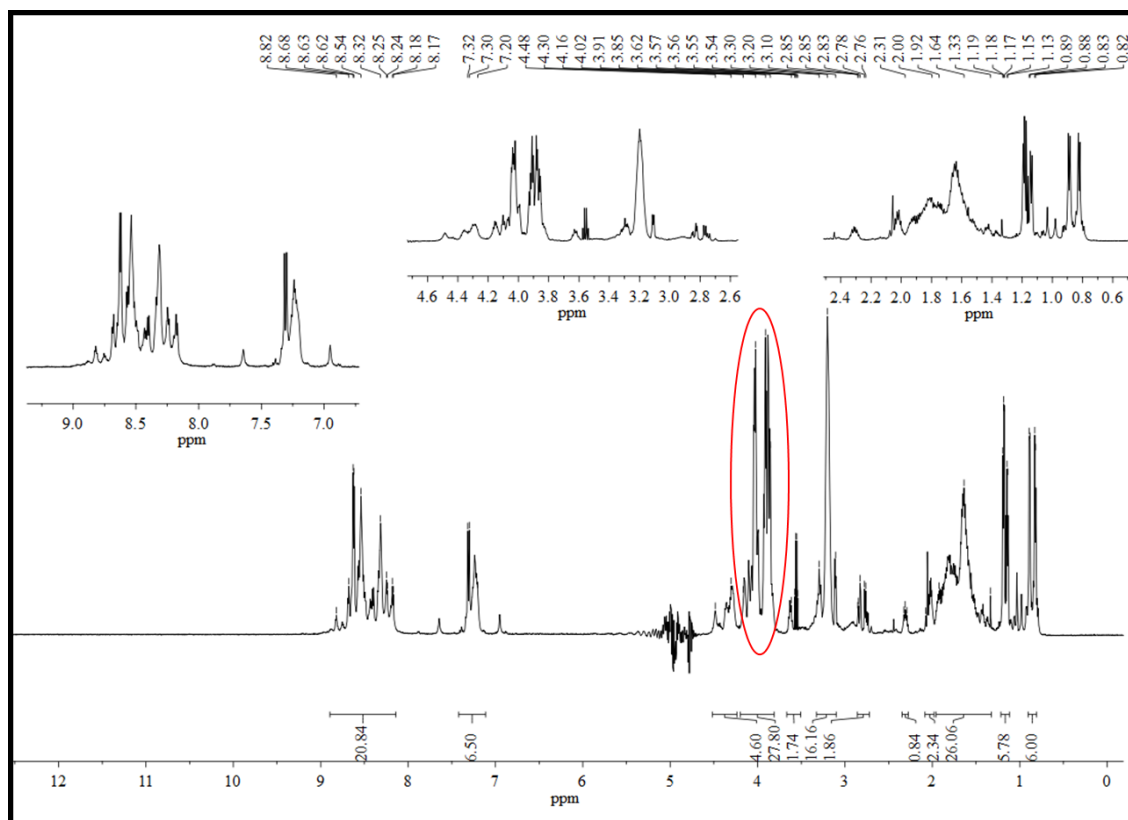


Abb. 190: ^1H -NMR-Spektrum von D3-(SG) $_7$ C 49 (600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1). Veränderungen im NMR-Spektrum durch den Aminosäurespacer (SG) $_7$ sind rot markiert.

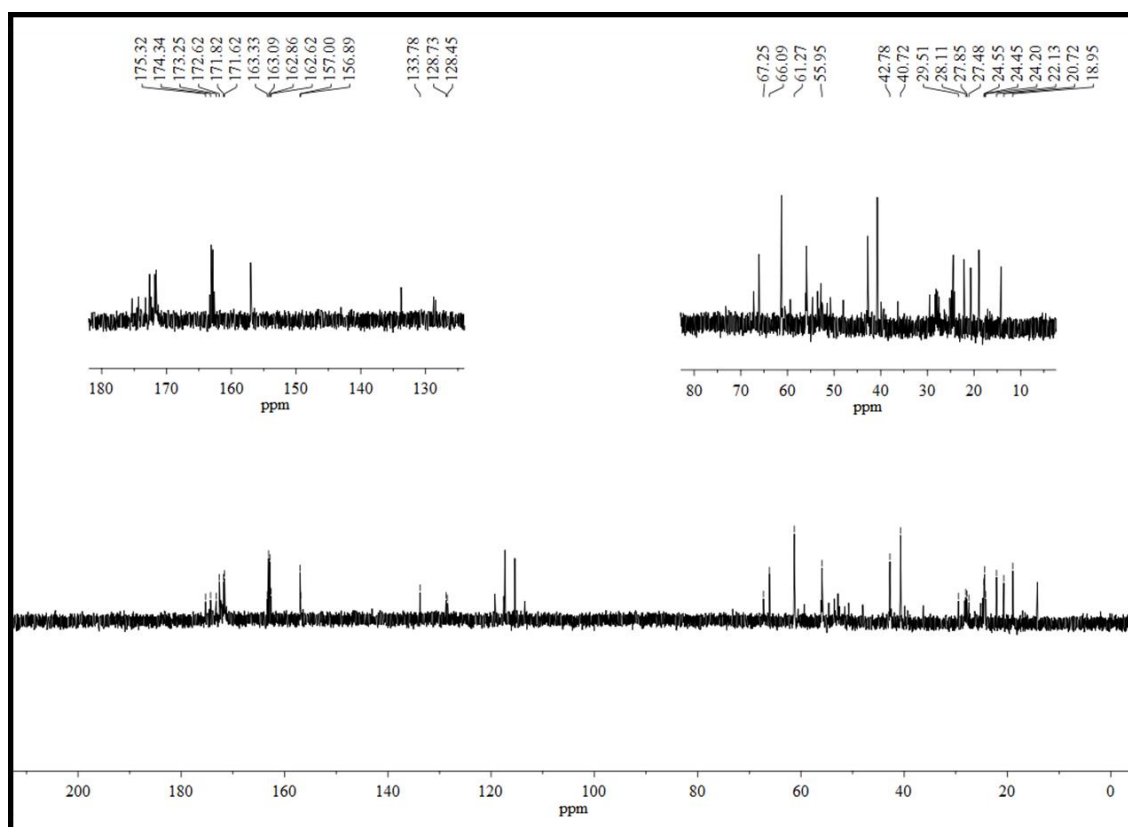


Abb. 191: ^{13}C -NMR-Spektrum von D3-(SG) $_7$ C 49 (125 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1).

5.3 Manuelle Festphasenpeptidsynthese

Allgemeine Vorschrift II:

Bei der manuellen Festphasenpeptidsynthese wurde ein Wang-Harz mit vorinstallierter Fmoc-geschützter Aminosäure verwendet. Das jeweilige Harz wurde eingewogen und vor Reaktionsbeginn in einem DMF/NMP-Gemisch gequollen. Die Aktivierung des Carboxylkohlenstoffs der Aminosäuren erfolgte mit HCTU und HOBt. Als Katalysator wurde die Base DIPEA hinzugegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur und unter ständigem Schütteln durchgeführt. Nach erfolgreicher Kupplung wurde das Harz gewaschen. Für die nächste Kupplung musste zuerst die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten werden. Für die Fmoc-Entschützung wurde eine 20%ige Piperidinlösung (in DMF/NMP) für 3 Minuten zu dem Harz gegeben und bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Entfernen der Lösung wurde das Harz erneut mit einer Piperidinlösung versetzt und für 10 Minuten geschüttelt. Nach Entfernung der Piperidinlösung und Waschen des Harzes mit DMF konnte die nächste Aminosäure gekuppelt werden.

Tab. 15: Durchführung der einzelnen Reaktionsschritte bei einer manuellen Peptidsynthese.

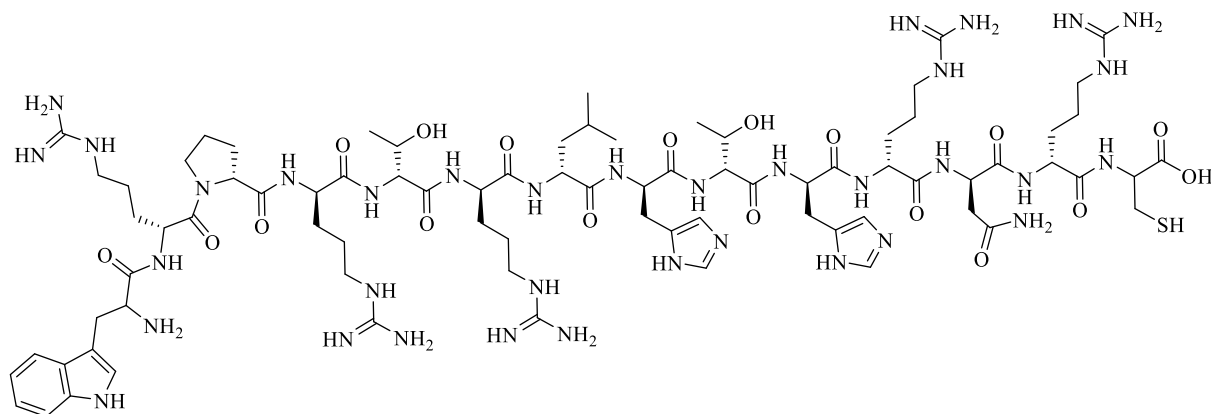
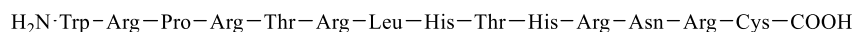
Reaktionsschritt	Reagenzien	Zeit
1. Quellen des Harzes	500 µL DMF/NMP	120 Minuten
2. Fmoc-Abspaltung	1. 500 µL 20 % Piperidin in DMF/NMP 2. 170 µL DMF/NMP und 330 µL 20 % Piperidin in DMF/NMP Anschließend Waschen mit je 5x 500 µL DMF	1. 3 Minuten 2. 10 Minuten
3. Kupplung	4 äq Fmoc-AS-OH in 4 äq HOBt lösen (0.45 mol/L in DMF/NMP) 4 äq HCTU (0.45 mol/L in DMF/NMP) 8 äq DIPEA (1.2 mol/L in NMP)	2 h bis 24 h
4. Trocknung	5x 500 µL DMF 5x 500 µL DCM 5x 500 µL Diethylether	

Nach erfolgter Synthese wurde das Harz getrocknet und das synthetisierte Peptid vom Harz abgespalten (Spaltung der kovalenten Bindung zwischen C-terminaler Aminosäure und der Ankergruppe des polymeren Trägers). Für die Abspaltung wurde zu dem Harz ein Cleavage-Cocktail aus Trifluoressigsäure (93 %), Triisopropylsilan (5 %) und dest. Wasser (2 %) gegeben und 4 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Peptid wurde aus kaltem Diethylether gefällt und dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen. Anschließend wurde das Peptid in 0.1 % wässriger TFA gelöst und gefriergetrocknet. Die Reinheit der Peptide wurde mittels HPLC, NMR- und Massenspektroskopie überprüft.

Allgemeine Vorschrift III:

Bei der Kupplung von trimeren Aminopyrazolliganden mit verschiedenen Peptidketten wurde wie in der allgemeinen Vorschrift II verfahren. Zuerst wurden die am Harz immobilisierten Peptide Fmoc entschützt und anschließend die PMB-geschützte Trimersäure **44** an den N-Terminus des Peptids gekuppelt. Nach der Abspaltung vom Harz mussten bei dem Rohprodukt zusätzlich die PMB-Schutzgruppen entfernt werden. Hierzu wurde das Rohprodukt unter Argonatmosphäre in Trifluoressigsäure (4 mL) gelöst und 5 h bei 70 °C gerührt. Nach Reaktionsende wurde die Lösung langsam auf 0 °C abgekühlt und das Produkt aus Diethylether fraktioniert gefällt. Die einzelnen Fraktionen wurden dreimal mit Diethylether gewaschen, in 0.1 % wässriger TFA gelöst und gefriergetrocknet. Die Überprüfung der Reinheit erfolgte mittels HPLC.

Synthese von (S)-Tryptophanyl-(R)-argininyl-(R)-prolinyl-(R)-argininyl-(R)-threoninyl-(R)-argininyl-(R)-leucinyl-(R)-histidinyl-(R)-threoninyl-(R)-histidinyl-(R)-argininyl-(R)-asparaginyl-(R)-arginyl-(S)-cystein 31 (Trp-D3-Cys)



Für die Herstellung des Peptids Trp-D3-Cys wurde ein mit Fmoc-Cys(Trt) vorbeladenes Wang-Harz verwendet. Das Harz hatte eine Beladungszahl von 0.57 mmol/g. Zuerst wurde das Peptid D3-Cys (**28**) nach der allgemeinen Vorschrift I am Peptidsynthesizer hergestellt. Anschließend wurde die letzte Aminosäure (Tryptophan) manuell nach der allgemeinen Vorschrift II gekuppelt:

Kupplungseinwaagen:

D3-Cys(Trt)-Wang-Harz:	103.0 mg (0.06 mmol, 1.0 äq)
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH:	123.7 mg (0.24 mmol, 4.0 äq)
HCTU:	97.2 mg (0.24 mmol, 4.0 äq)
DIPEA:	0.08 mL (0.47 mmol, 8.0 äq)
Cl-HOBt:	39.8 mg (0.24 mmol, 4.0 äq)
DMF/NMP (80:20):	2.0 mL

Die Reaktionslösung wurde für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung entfernt, das Harz gewaschen und die Reaktion erneut durchgeführt (Doppelkupplung). Die Fmoc-Abspaltung erfolgte mittels Piperidin. Die Lösung wurde entfernt, das Harz mit DMF gewaschen und anschließend getrocknet (5x 500 µL DMF, 5x 500 µL DCM, 5x 500 µL Diethylether). Nach einer Totalabspaltung vom Harz konnte das Peptid **31** erhalten und mittels HPLC analysiert werden.

^1H -NMR (600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1)) δ [ppm] = 0.82- 0.90 (2d, 6H, 2CH_3), 1.14-1.18 (2d, 3H, CH_3), 1.24-1.26 (t, 2H, CH), 1.32-2.08 (m, 43H, CH_2), 2.28-2.34 (m, 2H, CH_2), 2.77-2.90 (m, 6H, CH_2), 2.97-3.06 (m, 4H, CH_2), 3.19-3.46 (m, 16H, CH_2), 3.50-3.62 (m, 6H, CH_2), 3.75-3.79 (m, 1H, CH_2), 4.14-4.16 (m, 2H, CH), 4.20-4.23 (m, 2H, CH_2), 4.27-4.36 (m, 5H, CH), 7.18-7.35 (m, 10H, CH_{arom} , NH, NH_2), 7.51-7.58 (2d, 4H, NH_2), 7.67-7.69 (m, 1H, NH), 8.20-8.21 (m, 1H, NH), 8.26-8.30 (m, 2H, NH), 8.33-8.35 (m, 1H, NH), 8.44-8.47 (m, 2H, NH), 8.54-8.72 (m, 6H, NH), 10.28 (s, 1H, NH).

HPLC-Reinheit: 90.8 % (RP 18 Säule, 214 nm, Flussrate 0.5 mL/min, Retentionszeit: 14.2 min, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min, Eluent A: Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Molare Masse: 1889.19 g/mol

Chemische Summenformel: $\text{C}_{79}\text{H}_{129}\text{N}_{35}\text{O}_{18}\text{S}$ (Monomer)

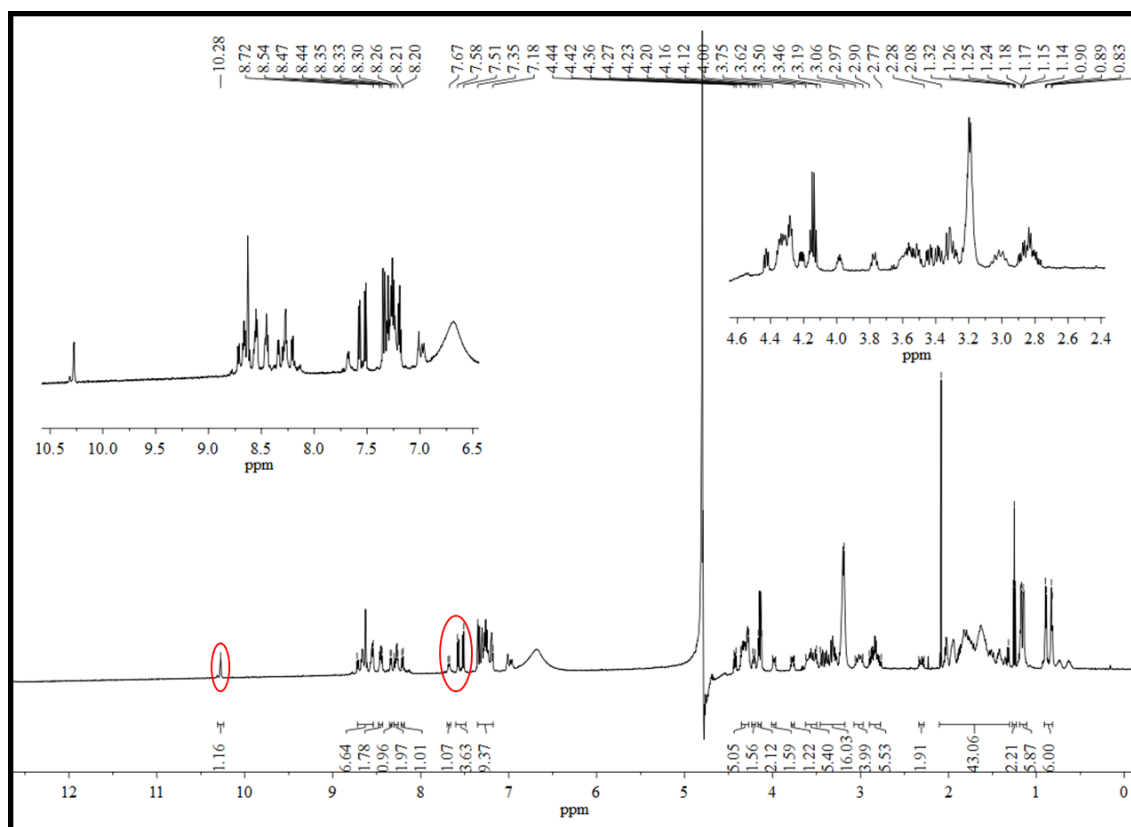
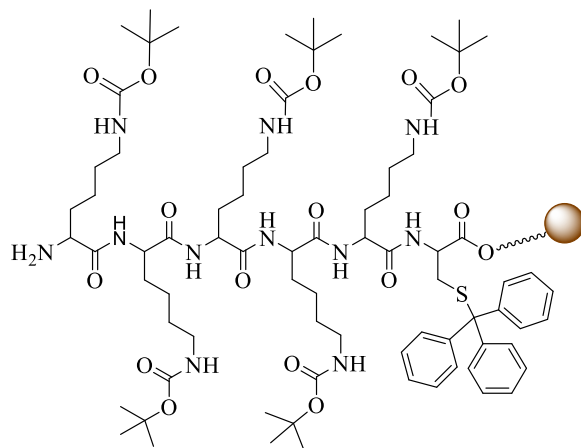


Abb. 192: ^1H -NMR-Spektrum von Trp-D3-Cys 31 (600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1). Veränderungen im NMR-Spektrum durch die zusätzliche Aminosäure Tryptophan sind rot markiert.

Synthese von festphasengebundenem Amino-(S)-lysiny(Boc)-(S)-lysiny(Boc)-(S)-lysiny(Boc)-(S)-lysiny(Boc)-(S)-lysiny(Boc)-(S)-cystein **51 (KKKKKC)**



Für die Herstellung des Peptidspacers (Lys)₅-Cys wurde ein mit Fmoc-Cys(Trt) vorbeladenes Wang-Harz verwendet. Das Harz hatte eine Beladungszahl von 0.57 mmol/g. Das Peptid (**51**) wurde nach der allgemeinen Vorschrift I am Peptidsynthesizer hergestellt.

Kupplungseinwaagen:

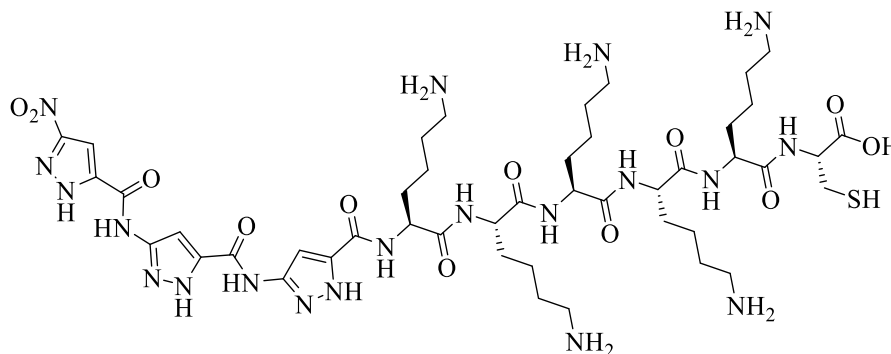
Fmoc-L-Cys(Trt)-Wang-Harz:	0.17 g (0.1 mmol, 1.0 äq)
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH:	1.50 g in 14 mL DMF
HCTU:	2.07 g in 10 mL DMF
DIPEA:	3.5 mL in 6.5 mL NMP
Piperidin:	30 mL in 120 mL DMF
DMF:	1.0 L
DCM:	83 mL

Zur Überprüfung der Reinheit des Peptids wurde eine Testabspaltung durchgeführt und das Peptid **51** mittels HPLC und LC-MS analysiert.

MS (ESI): $[M+H]^+ = m/z$ ber. für C₃₃H₆₇N₁₁O₇S: 762.50, gef.: 762.50; $[M-H]^- = m/z$ ber. für C₃₃H₆₆N₁₁O₇S: 760.49, gef.: 760.64.

HPLC-Reinheit: 77.9 % (RP 18 Säule, 214 nm, Flussrate 0.5 mL/min, Retentionszeit: 6.6 min, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min, Eluent A: Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Synthese von 3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido-(*S*)-lysiny-(*S*)-lysiny-(*S*)-lysiny-(*S*)-lysiny-(*S*)-lysiny-(*S*)-cysteinein **46 (Trim_5+)**



An den *N*-terminus des Peptids **50** (Beladung 0.57 mmol/g) wurde manuell 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäure **44** geknüpft (nach der allgemeinen Vorschrift III).

Kupplungseinwaagen:

(Lys(Boc)) ₅ -Cys(Trt)-Wang-Harz:	56.4 mg (0.03 mmol, 1.0 äq)
PMB-Trimersäure (44):	94.6 mg (0.13 mmol, 4.0 äq)
HCTU:	53.2 mg (0.13 mmol, 4.0 äq)
DIPEA:	0.04 mL (0.47 mmol, 8.0 äq)
Cl-HOBt:	21.8 mg (0.13 mmol, 4.0 äq)
DMF/NMP (80:20):	2.0 mL

Die Reaktionslösung wurde für 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung entfernt, das Harz mit DMF gewaschen und getrocknet (5x 500 µL DMF, 5x 500 µL DCM, 5x 500 µL Diethylether).

Nach einer Totalabspaltung vom Harz und PMB-Entschützung konnte das Produkt **46** erhalten und mittels HPLC und LC-MS analysiert werden.

^1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 1.33- 1.71 (m, 32H, CH_2), 2.75 (bs, 12H, CH_2), 4.23 (m, 5H, CH), 4.41 (m, 1H, CH), 7.78 (bs, 17H, NH_2), 7.93-8.08 (m, 5H, CH), 11.47 (bs, 1H, NH_{Amid}).

MS (ESI): $[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = m/z$ ber. für $\text{C}_{45}\text{H}_{74}\text{N}_{20}\text{O}_{12}\text{SNa}_2$: 585.27, gef.: 585.88; $[\text{M}+3\text{H}]^{3+} = m/z$ ber. für $\text{C}_{45}\text{H}_{72}\text{N}_{20}\text{O}_{12}\text{SKNa}$: 392.49, gef.: 391.02.

HPLC-Reinheit: 96.6 % (RP 18 Säule, 214 nm, Flussrate 0.5 mL/min, Retentionszeit: 16.6 min, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min, Eluent A: Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Molare Masse: 1119.26 g/mol

Chemische Summenformel: $\text{C}_{45}\text{H}_{74}\text{N}_{20}\text{O}_{12}\text{S}$ (Monomer)

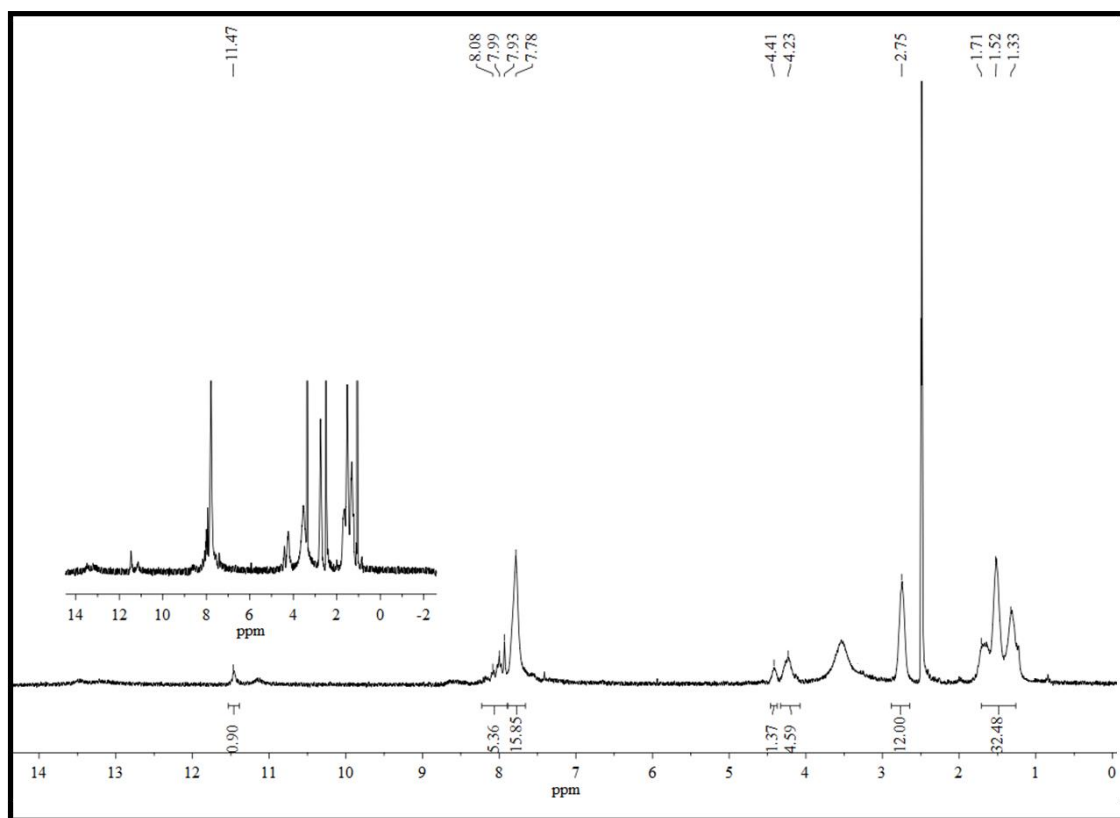


Abb. 193: ^1H -NMR-Spektrum von Trim_5+ 46 (300 MHz, DMSO- d_6).

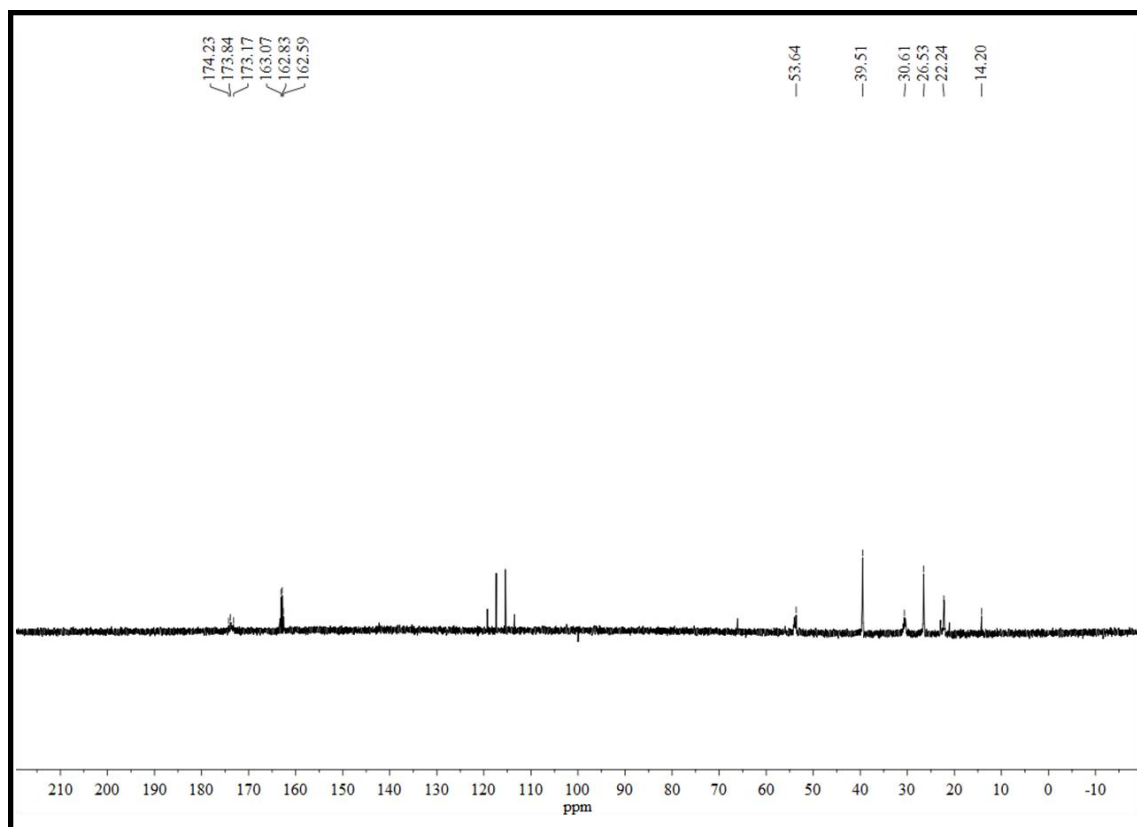
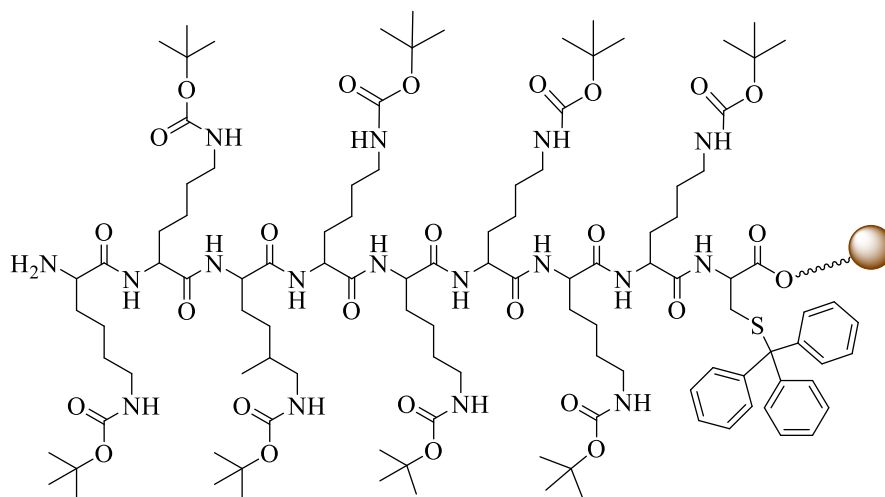


Abb. 194: ^{13}C -NMR-Spektrum von Trim_5+ 46 (125 MHz, DMSO-d_6).

Synthese von festphasengebundenem Amino-(S)-lysiny(Boc)-(S)-lysiny(Boc)-(S)-lysiny(Boc)-(S)-lysiny(Boc)-(S)-lysiny(Boc)-(S)-lysiny(Boc)-(S)-cystein **52 (KKKKKKKC)**



Für die Herstellung des Peptidspacers (Lys)₈-Cys wurde ein mit Fmoc-Cys(Trt) vorbeladenes Wang-Harz eingesetzt. Die Beladungszahl lag bei 0.57 mmol/g. Das Peptid (**52**) wurde nach der allgemeinen Vorschrift I am Peptidsynthesizer synthetisiert.

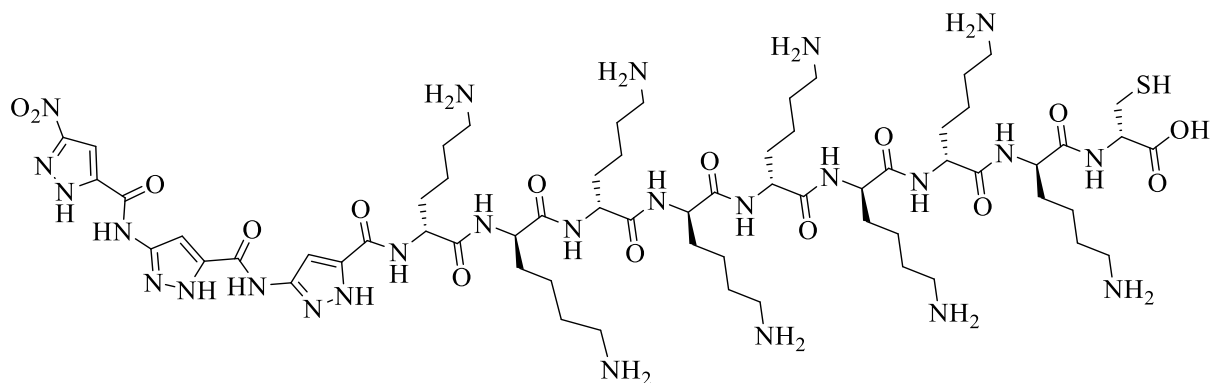
Kupplungseinwaagen:

Fmoc-L-Cys(Trt)-Wang-Harz:	0.17 g (0.1 mmol, 1.0 äq)
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH:	2.16 g in 14 mL DMF
HCTU:	2.9 g in 14 mL DMF
DIPEA:	3.5 mL in 6.5 mL NMP
Piperidin:	40 mL in 160 mL DMF
DMF:	1.5 L
DCM:	83 mL

Zur Überprüfung der Reinheit des Peptids wurde eine Testabspaltung durchgeführt und das Peptid **52** mittels HPLC analysiert werden.

HPLC-Reinheit: 79.5 % (RP 18 Säule, 214 nm, Flussrate 0.5 mL/min, Retentionszeit: 6.9 min, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min, Eluent A: Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Synthese von 3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido-(*S*)-lysiny-(*S*)-lysiny-(*S*)-lysiny-(*S*)-lysiny-(*S*)-lysiny-(*S*)-lysiny-(*S*)-lysiny-(*S*)-cystein **47 (Trim_8+)**



N-terminal wurde 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäure **44** manuell an das Peptid **52** (Beladung 0.57 mmol/g) nach der allgemeinen Vorschrift III gekuppelt.

Kupplungseinwaagen:

(Lys(Boc)) ₈ -Cys(Trt)-Wang-Harz:	61.0 mg (0.03 mmol, 1.0 äq)
PMB-Trimersäure (44):	102.3 mg (0.13 mmol, 4.0 äq)
HCTU:	57.5 mg (0.13 mmol, 4.0 äq)
DIPEA:	0.05 mL (0.27 mmol, 8.0 äq)
Cl-HOBt:	23.6 mg (0.13 mmol, 4.0 äq)
DMF/NMP (80:20):	2.0 mL

Die Lösung wurde für 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde entfernt, das Harz mit DMF gewaschen und anschließend getrocknet (5x 500 µL DMF, 5x 500 µL DCM, 5x 500 µL Diethylether).

Nach der Totalabspaltung vom Harz und PMB-Entschützung konnte das Produkt **47** erhalten und mittels HPLC und LC-MS analysiert werden.

^1H -NMR (600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1)) δ [ppm] = 1.42- 1.91 (m, 50H, CH_2), 3.00 (bs, 18H, CH_2), 3.34-3.63 (m, 1H, CH), 4.28-4.35 (m, 7H, CH), 4.46-4.49 (m, 1H, CH), 6.78-6.89 (m, 2H, CH), 7.54 (bs, 10H, NH_2), 8.27-8.57 (m, 8H, CH), 10.83 (bs, 1H, NH_{Amid}).

^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1)) δ [ppm] = 22.2, 26.5, 30.7, 39.5, 53.6, 162.6, 162.8, 163.1, 163.3, 173.6.

MS (ESI): $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+} = m/z$ ber. für $\text{C}_{63}\text{H}_{109}\text{N}_{26}\text{O}_{16}\text{SK}$: 778.39, gef.: 778.01; $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+} = m/z$ ber. für $\text{C}_{63}\text{H}_{109}\text{N}_{26}\text{O}_{16}\text{SK}$: 519.28, gef.: 519.16; $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+} = m/z$ ber. für $\text{C}_{63}\text{H}_{109}\text{N}_{26}\text{O}_{16}\text{SK}$: 389.46, gef.: 389.67.

HPLC-Reinheit: 97.7 % (RP 18 Säule, 214 nm, Flussrate 0.5 mL/min, Retentionszeit: 16.2 min, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min, Eluent A: Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Molare Masse: 1503.80 g/mol

Chemische Summenformel: $\text{C}_{63}\text{H}_{110}\text{N}_{26}\text{O}_{16}\text{S}$ (Monomer)

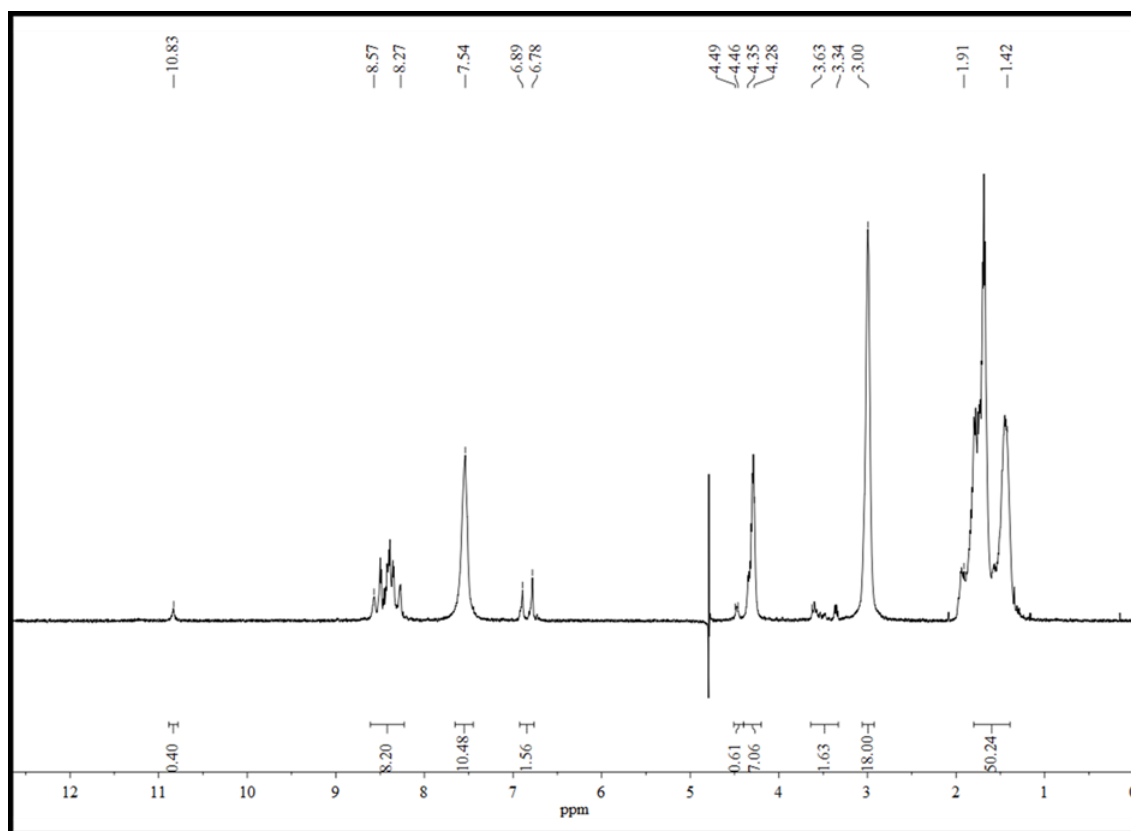


Abb. 195: ^1H -NMR-Spektrum von Trim_8+ 47 (600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1).

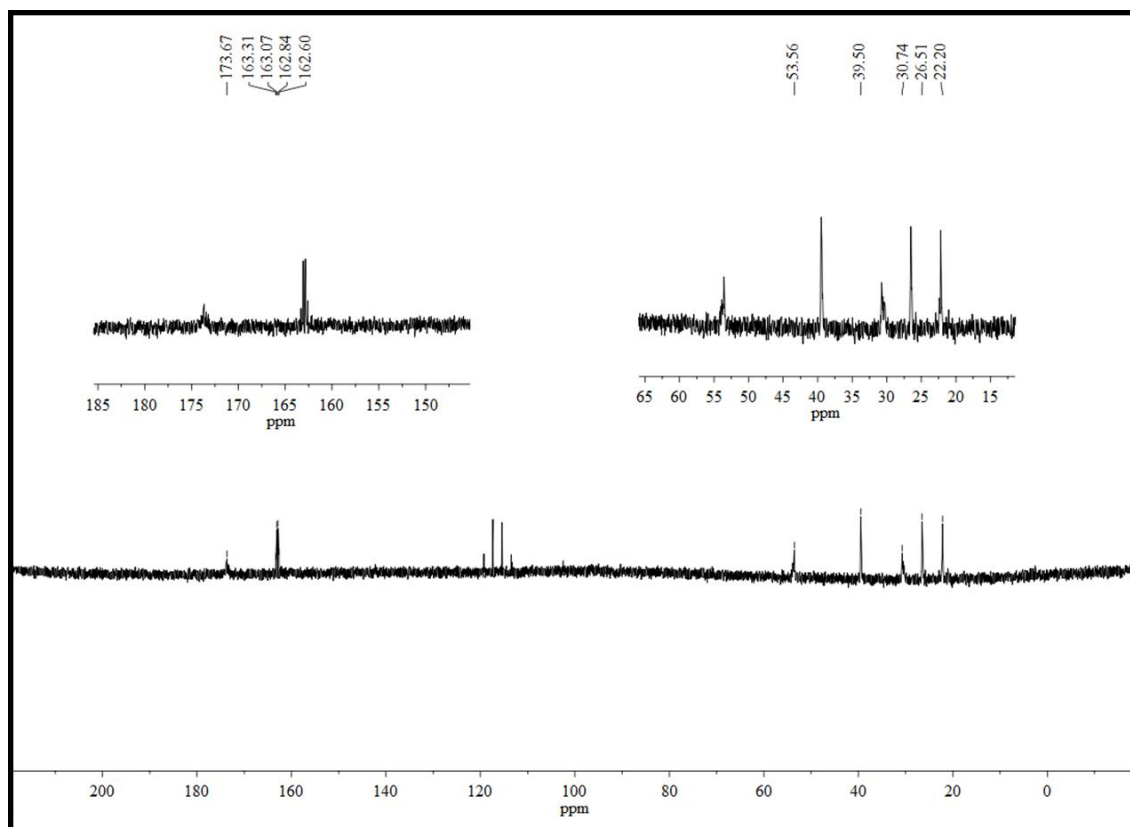
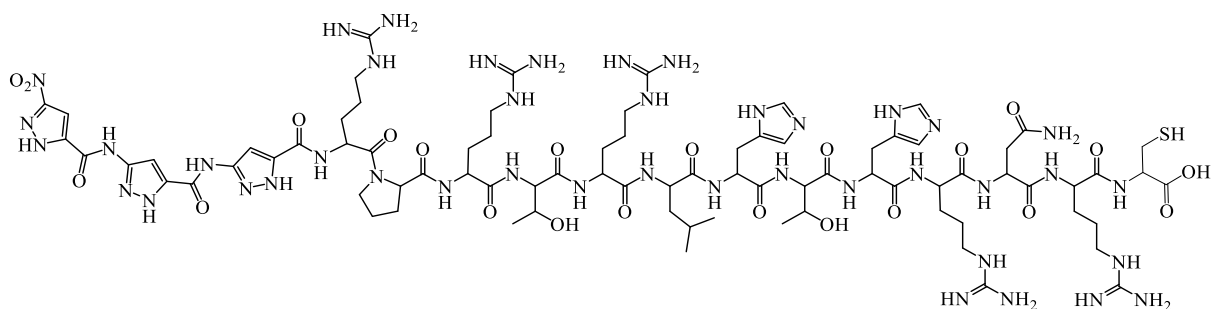


Abb. 196: ^{13}C -NMR-Spektrum von Trim_8+ 47 (125 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1).

Synthese von 3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido-(*R*)-argininyl-(*R*)-prolinyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-threoninyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-leucinyl-(*R*)-histidinyl-(*R*)-threoninyl-(*R*)-histidinyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-asparaginyl-(*R*)-arginyl-(*S*)-cystein 48 (Hybrid_5+)



1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäure **44** wurde manuell an den *N*-Terminus des Peptids D3_5+ **28** (Beladung 0.57 mmol/g) gekuppelt. Das Peptid **28** wurde nach der allgemeinen Vorschrift I hergestellt, bei dem letzten Kupplungsschritt, der Knüpfung des Aminopyrazoltrimers an das Peptid an der festen Phase wurde nach der allgemeinen Vorschrift III verfahren.

Kupplungseinwaagen:

D3-Cys(Trt)-Wang-Harz:	62.9 mg (0.04 mmol, 1.0 äq)
PMB-Trimersäure (44):	105.5 mg (0.13 mmol, 4.0 äq)
HCTU:	59.3 mg (0.14 mmol, 4.0 äq)
DIPEA:	0.05 mL (0.29 mmol, 8.0 äq)
Cl-HOBt:	24.3 mg (0.14 mmol, 4.0 äq)
DMF/NMP (80:20):	2.0 mL

Die Lösung wurde für 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde entfernt, das Harz mit DMF gewaschen und anschließend getrocknet (5x 500 µL DMF, 5x 500 µL DCM, 5x 500 µL Diethylether).

Nach der Totalabspaltung vom Harz und PMB-Entschützung konnte das Produkt **48** erhalten und mittels HPLC und LC-MS analysiert werden.

^1H -NMR (600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1)) δ [ppm] = 0.82- 0.89 (m, 6H, 2CH_3), 1.13-1.20 (m, 3H, CH_3), 1.30-1.38 (m, 3H, CH_3), 2.80-3.01 (m, 4H, CH_2), 3.19 (bs, 12H, CH_2), 3.37-3.68 (m, 4H, CH_2), 4.15-4.31 (m, 4H, CH), 6.95-7.54 (m, 8H, NH, NH_2), 8.62-8.96 (m, 10H, NH).

MS (ESI): $[\text{M}+3\text{H}]^{3+} = m/z$ ber. für $\text{C}_{80}\text{H}_{123}\text{N}_{42}\text{O}_{22}\text{S}$: 686.32, gef.: 686.73; $[\text{M}+4\text{H}]^{4+} = m/z$ ber. für $\text{C}_{80}\text{H}_{122}\text{N}_{42}\text{O}_{22}\text{S}$: 514.73, gef.: 515.04.

HPLC-Reinheit: 98.8 % (RP 18 Säule, 214 nm, Flussrate 0.5 mL/min, Retentionszeit: 18.6 min, linearer Gradient 95-40 % Eluent A in 30 min, Eluent A: Wasser, Eluent B: Acetonitril).

Molare Masse: 2060.22 g/mol

Chemische Summenformel: $\text{C}_{80}\text{H}_{126}\text{N}_{42}\text{O}_{22}\text{S}$ (Monomer)

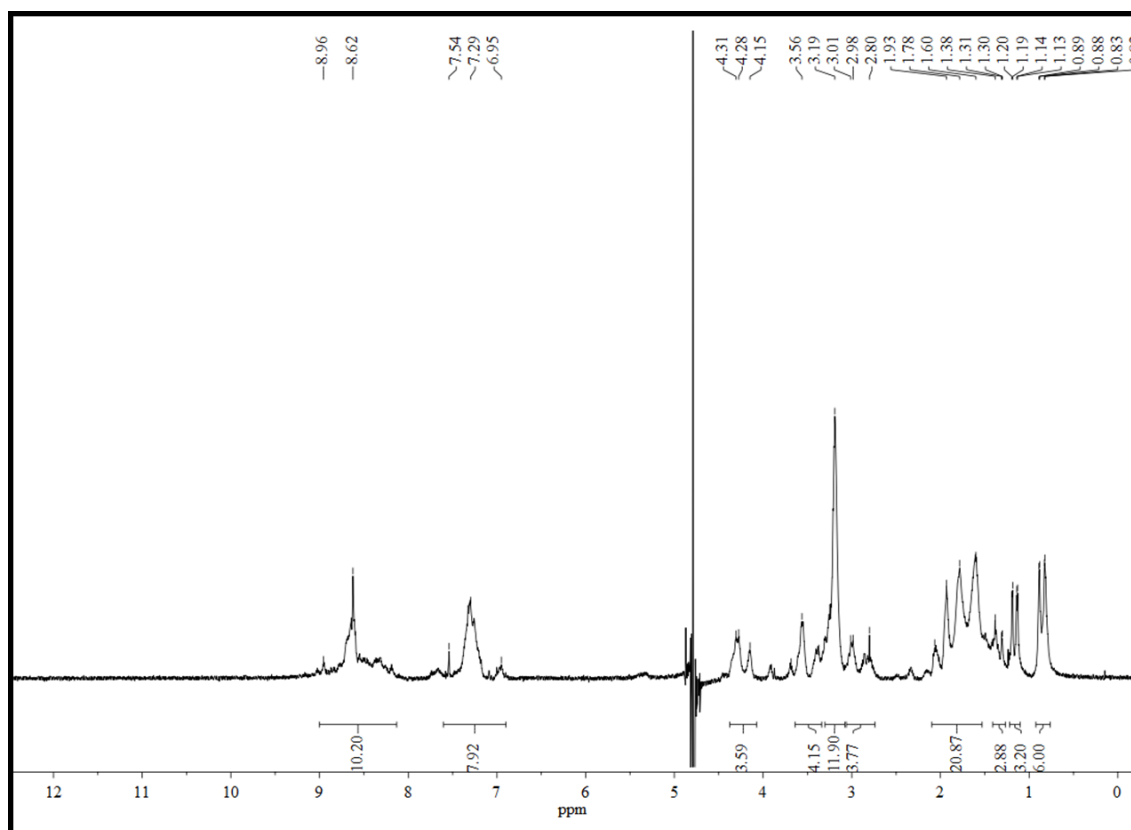


Abb. 197: ^1H -NMR-Spektrum von Hybrid_5+ 48 (600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1).

5.4 Monomerisierung von A β (1-42)

Die Peptide A β (1-42) und A β -FITC jeweils von der Firma *Bachem* wurden vor den Experimenten mit 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben lyophilisiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Portionierung wurde A β erneut in HFIP gelöst (1 mg/mL), in Eppendorfgefäße überführt und lyophilisiert.

5.5 Goldnanopartikelsynthese mittels Laserablation

Die in dieser Arbeit verwendeten Goldnanopartikel in Lösung wurden mittels Laserablation von *Carmen Streich* aus dem Arbeitskreis Barcikowski (Technische Chemie, Universität Duisburg-Essen) hergestellt. Hierzu wurde ein dünnes Goldtarget (AGOSI, Reinheit 99,99 %) in 30 mL NaCl-Lösung ($c = 0.1$ mM) in eine mit einem elektrischen Rotor betriebene Batch-Abkammer aus Teflon eingespannt. Durch ein Quarzfenster wurde ein Laser mit einer Pulsenenergie von 34 A und einer Repetitionsrate von 15 kHz gelenkt, welcher auf das Target gerichtet wurde. Innerhalb von zehn Minuten konnten die gewünschten Nanopartikel freigesetzt und unter ständigem Rühren in der Lösung gleichmäßig verteilt werden. Die gewählte Natriumchloridkonzentration diente der Größeneinstellung, ebenfalls waren die Nanopartikel durch die angelagerten Anionen elektrostatisch stabilisiert. Das Goldtarget wurde vor und nach Laserablation gewogen, durch die Massendifferenz konnte die Goldkonzentration in dem Rohabtrag bestimmt werden. Die Abtrennung größerer Nanopartikel ($d > 20$ nm) erfolgte durch Zentrifugation. Der Überstand wurde abpipettiert und analysiert, das Pellet mit den größeren Nanopartikeln verworfen. Die Analyse der Partikelgröße erfolgte mit Hilfe eines UV/Vis-Spektrometers (Extinktion bei 380 nm) und einer Scheibenzentrifuge. Die Goldnanopartikellösung wurde mit MilliQ-Wasser auf eine Konzentration von 50 $\mu\text{g/mL}$ verdünnt und konnte über längere Zeit im Kühlschrank gelagert werden.^[178]

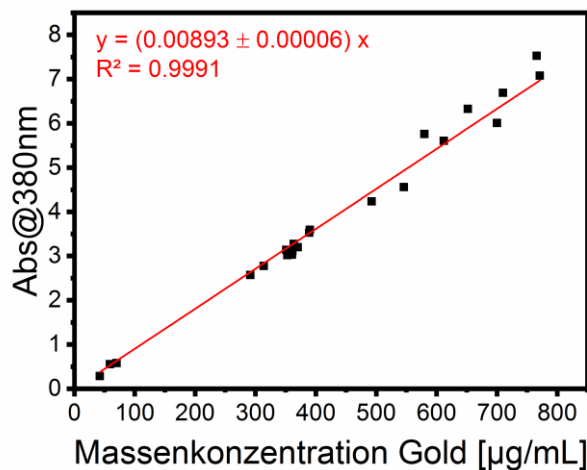


Abb. 198: Kalibriergerade bei einer Extinktion von 380 nm zur Bestimmung der Massenkonzentration von Goldnanopartikeln.^[179]

5.6 Analytische Scheibenzentrifugation

Eine analytische Scheibenzentrifugation wurde zur Bestimmung der hydrodynamischen Nanopartikelgröße genutzt. Dies wurde von *Carmen Streich* aus dem Arbeitskreis Barcikowski (Technische Chemie, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt. Hierbei wurde die Nanopartikellösung in eine rotierende und mit Flüssigkeit gefüllte Scheibe gegeben und zentrifugiert (24 000 rpm). Die Nanopartikel wanderten durch die Zentrifugalbeschleunigung entgegen eines eingesetzten Dichtegradienten. Der Gradient bestand aus einer Saccharoselösung unterschiedlicher Konzentrationen (24 bis 8 Gew%). Die Nanopartikel sedimentierten unterschiedlich stark, so dass hierdurch eine Auftrennung nach der Größe erfolgen konnte. Für die Größenkalibrierung wurde ein Standard verwendet ($d = 0.237 \mu\text{m}$).^[179]

5.7 Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zetapotential

Ein weiteres Verfahren zur Bestimmung der Nanopartikelgröße war die dynamische Lichtstreuung (DLS), welche von *Carmen Streich* aus dem Arbeitskreis Barcikowski (Technische Chemie, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt wurde. Suspendierte Partikel streuen das Licht nahezu gleichmäßig in alle Raumrichtungen. Nanopartikel bewegen sich in einem Dispersionsmittel allerdings nach der Brown'schen Molekularbewegung. Werden also Partikel zu verschiedenen Zeiten mehrmals bestrahlt, so führt die Bewegung der Partikel zu Schwankungen des gestreuten Lichts.

Bei der DLS werden die Interferenzen erfasst und somit zur Ermittlung der Partikelgrößenverteilung herangezogen. Der hydrodynamische Radius der Nanopartikeln ließ sich durch die Stokes-Einstein-Beziehung errechnen:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (1)$$

R_h = hydrodynamischer Radius

$k_B = 1.38 \cdot 10^{-23}$ J/K (Boltzmann-Konstante)

T = absolute Temperatur

η = Viskosität des Dispersionsmittels

D = Diffusionskoeffizient

Mit der Messung eines Zetapotentials war es möglich, eine Aussage über die elektrostatische Stabilität von Nanopartikeln zu tätigen. Durch ein angelegtes elektrisches Feld wanderten Nanopartikel durch ihre spezifische Oberflächenladung zu der Elektrode mit der umgekehrten Ladung. Anhand der Wanderungsgeschwindigkeit konnte anschließend das Zetapotential durch Berechnungen nach Smoluchowski oder Hückel bestimmt werden.

Sowohl für DLS-, als auch Zetapotentialmessungen wurden Kunststoffzellen (DTS 1070) der Firma *Malvern Instruments* verwendet. Das Probenvolumen betrug 750 μL , die Messtemperatur 25 °C. Zetapotentialmessungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.^[179]

5.8 Fluoreszenzquenchingexperimente

Die Affinität der Proben zu A β konnte durch Fluoreszenzquenchinguntersuchungen ermittelt werden, die im Rahmen einer Kooperation von *Carmen Streich* aus dem Arbeitskreis Barcikowski (Technische Chemie, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt wurden. Hierzu wurde fluorophorgelabeltes A β (A β -FITC) eingesetzt, bei dem die Fluoreszenz durch Annäherung an die Goldnanopartikeloberfläche gequenchet wurde. Somit konnten durch Messung der Fluoreszenzintensität Rückschlüsse auf Wechselwirkungen zwischen A β -FITC und den untersuchten Liganden oder Konjugaten geschlossen werden. Titrationsexperimente wurden in einer schwarzen 384-Well Mikrotiterplatte (Nunclo 384, *Sigma Aldrich*) durchgeführt. Eine Stocklösung aus Goldnanopartikel mit Ligand wurde auf die Mikrotiterplatte pipettiert ($c(\text{AuNP}) = 500 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{Ligand}) = 100 \mu\text{M}$ bei einem 418:1 Liganden/NP-Verhältnis, $c(\text{Ligand}) = 30 \mu\text{M}$ bei einem 125:1 Liganden/NP-Verhältnis, $c(\text{Ligand}) = 1 \mu\text{M}$ bei einem 4:1 Liganden/NP-Verhältnis). Eine 1:1-Verdünnungsreihe von Goldnanopartikeln wurde in jedes Well vorgelegt

($V_{\text{total}} = 45 \mu\text{L}/\text{Well}$). Anschließend wurde in jedes Well als nächstes äquivalente Mengen an gelabeltem A β -Protein gegeben ($c(\text{A}\beta\text{-FITC}) = 0.25 \mu\text{mol/L}$, $V = 45 \mu\text{L}$). Die Fluoreszenzmessungen erfolgten bei Raumtemperatur, mit einer Verstärkung von 100 % ($\lambda_{\text{Ex.}} = 485 \text{ nm}$ (Bandbreite 9 nm), $\lambda_{\text{Em.}} = 520 \text{ nm}$ (Bandbreite 20 nm), Anzahl der Blitze 25, Verzögerungszeit 0 μs , Integrationszeit 20 μs).

Unter der Annahme, dass bei einer Proteinbindung ein Gleichgewicht vorliegt ($\text{AuNP} + \text{Protein} \rightleftharpoons \text{AuNP} - \text{Protein}$) konnten die Quenchingdaten aus dem Hill-Fit berechnet werden:^[179]

$$B = B_{\text{max}} \frac{c^n}{(K_D)^n + c^n} \quad (2)$$

B = Fluoreszenzquenching

B_{max} = maximales Quenching

c = Nanopartikelkonzentration [nM]

K_D = Dissoziationskonstante [nM]

n = Kooperativitätsfaktor

Je höher die Affinität des Proteins zu dem eingegangenen Liganden, desto niedriger ist die Dissoziationskonstante des Komplexes.

5.9 AFM-Aufnahmen

Rasterkraftmikroskopiebilder wurden von *Jenny Bormann* aus dem Arbeitskreis Saccá (Bionanotechnologie, Universität Duisburg-Essen) aufgenommen. Bei der Visualisierung von A β -Fibrillen durch ein Atomkraftmikroskop wurden die zu untersuchenden Proben zuvor nach dem Protokoll von *Stine et al.* präpariert.^[197] Es wurden 100 μM zuvor monomerisiertes A β in 10 mM HCl bei 37 °C für 24 h in einem Thermomixer bei 650 rpm vorinkubiert. Nach der Inkubation wurden die Substanzen (AuNP, Liganden oder Konjugate) in einem 1:1 Verhältnis zu den A β -Proben pipettiert. Bei einer Endkonzentration von 50 μM A β , 125 $\mu\text{g/mL}$ AuNPs und 25 μM Ligand wurden die Proben weitere 7 Tage bei 37 °C inkubiert. Für die AFM-Aufnahmen wurden jeweils 10 μL der Proben auf einen Mica-Träger gegeben. Nach 5 Minuten Einwirkzeit wurden die Proben unter Argonstrom getrocknet und vermessen.^[179]

5.10 TEM-Aufnahmen

Die nach Kapitel 5.9 hergestellten Proben wurden zusätzlich an einem Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Hierfür wurden 5 μL der Probenlösung auf beschichtete Nickel- oder Kupfernetzchen pipettiert und getrocknet. Damit organische Substanzen in TEM-Bildern sichtbar wurden, mussten diese mit einem Kontrastmittel angefärbt werden. Auf die Objektträgernetzchen mit den getrockneten Proben wurden 5 μL Uranylacetatlösung (2 % in EtOH) gegeben und die Netzchen nach drei Minuten Einwirkzeit in einem Tropfen bidest. Wasser (30 μL) gewaschen. Nach erneuter Trocknung konnten die Proben vermessen werden. Die TEM-Aufnahmen wurden von *Dr. Markus Heidelmann* vom *Interdisciplinary Center for Analytics on the Nanoscale* (ICAN, Duisburg) und *Dipl.-Ing. Jurij Jakobi* aus dem Arbeitskreis Barcikowski (Technische Chemie, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt.^[179]

5.11 ThT-Fluoreszenzmessungen

5.11.1 Kinetikmessungen von A β (1-42)

Für den Kinetikverlauf der A β -Aggregation wurde eine Lösung (60 μL) aus 10 μM zuvor monomerisiertem A β in 10 mM PBS und 3.03 μM ThT angesetzt und in eine 384-Well Platte (Nunc GmbH) pipettiert. Die ThT-Fluoreszenzintensität wurde jede Stunde bei 37 °C ($\lambda_{\text{Ex.}} = 446 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em.}} = 490 \text{ nm}$) über drei Tage gemessen. Der Probenträger wurde vor jeder Messung 30 s orbital geschüttelt. Es wurden drei Messungen mit jeweiliger Vierfachbestimmung durchgeführt.

5.11.2 Inhibierung der Aggregation von 10 μM A β (1-42) mit 60 μM Ligand

Zuvor monomerisiertes A β (1-42) wurde für die Thioflavin T Fluoreszenzmessungen nach dem Gefriertrocknen mit DMSO (300 μM Endkonzentration) resuspendiert und konnte bei -20 °C gelagert werden. Ebenfalls wurde eine 62.7 μM Stammlösung aus ThT in bidest. Wasser hergestellt. Die Liganden wurden in einem 6-fachen Überschuss zu A β eingesetzt. Zur Überprüfung der Eigenfluoreszenz der Liganden oder unerwünschten Wechselwirkungen mit den Liganden wurden diese ohne A β sowohl mit als auch ohne ThT-Farbstoff untersucht.

Es konnten die hergestellten Liganden, reine Goldnanopartikel oder Platinnanopartikel und die entsprechenden Konjugate vermessen werden (Endkonzentration: $c(\text{A}\beta) = 10 \mu\text{M}$, $c(\text{Ligand}) = 60 \mu\text{M}$, $c(\text{AuNP}) = 300 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{PtNP}) = 333 \mu\text{g/mL}$). Es wurde jeweils auf insgesamt $60 \mu\text{L}$ Probenvolumen mit bidest. Wasser aufgefüllt. Lösungen aus reinem $\text{A}\beta$ in 10 mM PBS und ThT wurden als Kontrollproben verwendet. Nach 5 Tagen Inkubation in einem Thermomixer bei 37°C und 650 rpm wurden die Proben vermessen. Die Kontrolllösungen ohne $\text{A}\beta$ -Peptid konnten direkt vermessen werden. Die Fluoreszenzmessungen wurden in einer 384-Well Platte (Nunc GmbH) durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 37°C , einer 446 nm Excitationswellenlänge (Bandbreite 9 nm) und einer Emissionswellenlänge von 490 nm (Bandbreite 20 nm) vermessen. Jeder Messzyklus startete mit einem orbitalen Schütteln für 30 s zur Vermeidung von größeren $\text{A}\beta$ -Aggregaten. Jeder Messpunkt wurde über 40 Lichtblitze gemittelt. Die manuelle Verstärkung betrug 100% . Für die graphische Darstellung wurden drei Messungen mit jeweiliger Vierfachbestimmung durchgeführt.

Tab. 16: Zusammensetzung der ThT-Inhibierungsansätze.

	$\text{A}\beta(1-42)$ Stammlsg. $300 \mu\text{M}$ [μL]	Liganden- konzentration [μM]	Nano- partikel [$\mu\text{g/mL}$]	DMSO [μL]	10x PBS [μL]	ThT Stammlsg. $62.7 \mu\text{M}$ [μL]
Kontroll-lösung	2.0	-	-	-	6.0	2.9
$\text{A}\beta + \text{Ligand}$	2.0	60	-	-	6.0	2.9
$\text{A}\beta + \text{NP}$	2.0	-	300 (Au) 333 (Pt)	-	6.0	2.9
$\text{A}\beta + \text{NP/Ligand}$	2.0	60	300 (Au) 333 (Pt)	-	6.0	2.9
Ligand	-	60	-	2.0	6.0	-
Ligand + ThT	-	60	-	2.0	6.0	2.9
NP	-	-	300 (Au) 333 (Pt)	-	6.0	-
NP + ThT	-	-	300 (Au) 333 (Pt)	-	6.0	2.9

Bei höheren Goldnanopartikelkonzentrationen wurden statt zuvor 300 µg/mL Nanopartikel­lösung 900 µg/mL verwendet. Die Ligandenkonzentrationen (600 µM) änderten sich hier nicht. Für bifunktionale Goldnanopartikel (1:1) wurden jeweils 30 µM der beiden Liganden eingesetzt.

5.11.3 Inhibierung der Aggregation von 10 µM Aβ(1-42) mit 0.6 µM Ligand

Bei Messungen von anionische Konjugaten wurden die Proben wie zuvor in Kapitel 5.11.2 angesetzt. Die Ligandenkonzentration wurde allerdings auf 0.6 µM reduziert. Die Proben wurden mit folgenden Lösungen versetzt und ebenfalls mit bidest. Wasser auf ein Gesamtvolumen von 60 µL/Ansatz aufgefüllt:

Tab. 17: Zusammensetzung der ThT-Inhibierungsansätze bei anionischen Konjugaten.

	Aβ(1-42) Stammlsg. 300 µM [µL]	Liganden- konzentra- tion [µM]	Nanopar- tikel [µg/mL]	DMSO [µL]	10x PBS [µL]	ThT Stammlsg. 62.7 µM [µL]
Aβ + Lig- and	2.0	0.6	-	-	6.0	2.9
Aβ + NP/Ligand	2.0	0.6	300 (Au)	-	6.0	2.9
Ligand	-	0.6	-	2.0	6.0	-
Ligand + ThT	-	0.6	-	2.0	6.0	2.9

5.12 CD-Messungen

Der Einfluss der synthetisierten Liganden und deren Konjugate auf die Sekundärstruktur des A β (1-42)-Peptids wurde mittels CD-Messungen verfolgt.

Hierbei wurde eine 500 μ M Stammlösung des zuvor monomerisierten A β (1-42) in HFIP hergestellt. Es konnten sowohl alle Liganden, Nanopartikel als auch Liganden auf Nanopartikeln untersucht werden.

Tab. 18: Zusammensetzung der mittels CD-Messungen untersuchten Probenlösungen.

	Aβ(1-42) Stammlsg. 500 μM [μL]	Ligandenkonzentration [μM]	Nanopartikel [μg/mL]	KaPi 100 mM [μL]	HFIP [μL]
Kontrolllösung	20	-	-	96	-
Aβ + Ligand	20	10	-	96	-
Aβ + NP	20	-	50 (Au) 55 (Pt)	96	-
Aβ + NP/ Ligand	20	10	50 (Au) 55 (Pt)	96	-
Ligand	-	10	-	96	20
NP	-	-	50 (Au) 55 (Pt)	96	20

Die Lösungen wurden mit bidest. Wasser auf 1 mL Endvolumen aufgefüllt und 24 h in einem Thermomixer bei 37 °C und 650 rpm inkubiert. CD-Spektren wurden nach 0 h, 1 h und 1 Tag aufgenommen. Die Lösungen ohne A β -Peptid wurden direkt vermessen. Die CD-Messungen wurden bei 20 °C in einer 0.1 cm Küvette bei 200-400 nm aufgenommen (data pitch: 1 nm, response: 1 s, sensitivity: standard, scanning speed: 100 nm/min, accumulation: 1). Die Ligandenspektren/Nanopartikelspektren bzw. Konjugatspektren wurden für die Auswertung von den jeweiligen Gesamtspektren A β (1-42) + Ligand/Nanopartikel bzw. Konjugat subtrahiert.

Es wurden jeweils folgende Endkonzentration verwendet: $c(A\beta) = 10 \mu\text{M}$, $c(\text{Ligand}) = 10 \mu\text{M}$, $c(\text{AuNP}) = 50 \mu\text{g/mL}$. Die Ligandenkonzentrationen für anionische Konjugate betrugen $0.1 \mu\text{M}$. Für bifunktionale Goldnanopartikel (1:1) wurden jeweils $5 \mu\text{M}$ der beiden Liganden eingesetzt.

5.13 DGZ/ELISA

5.13.1 Dichtegradientenzentrifugation (DGZ)

Bei der Durchführung der DGZ wurden zunächst $36 \mu\text{g}$ zuvor monomerisiertes $A\beta(1-42)$ -Peptid in $100 \mu\text{L}$ NaPi (10 mM , $\text{pH} = 7.4$) gelöst. Es wurden $100 \mu\text{L}$ der zu untersuchenden Proben zu der Peptidlösung gegeben und diese für 90 Minuten oder 24 h bei 37°C und 400 rpm inkubiert. Es wurden sowohl Liganden, Nanopartikel, als auch Konjugate untersucht ($c(\text{AuNP}) = 400 \mu\text{g/mL}$; $c(\text{Ligand}) = 80 \mu\text{M}$). Als Kontrolle diente eine $A\beta$ -Lösung ($c = 40 \mu\text{M}$). Das Endvolumen der Proben betrug 200 mL .

Als DGZ-Gradient wurde eine Optiprep-Lösung (60-%ige Iodixanollösung der Firma *Axis Shield PoC AS*) mit unterschiedlichen Konzentrationen in Ultrazentrifugenröhrchen (*Quick Seal Polyallomer tubes*, 8.9 mL , *Beckman Coulter*) geschichtet. Die einzelnen Schichten bestanden aus: $1155 \mu\text{L}$ 50 %, $1155 \mu\text{L}$ 40 %, $1155 \mu\text{L}$ 30 %, $3455 \mu\text{L}$ 20 %, $1150 \mu\text{L}$ 10 %, $442 \mu\text{L}$ 5 % (v/v) Iodixanol in 10 mM NaPi ($\text{pH} = 7.4$). Im Anschluss wurde oben auf den Gradienten ein Probenvolumen von $200 \mu\text{L}$ pipettiert. Die Zentrifugation erfolgte bei 7°C und $287\,000 \text{ g}$ für 4.5 h in einer Ultrazentrifuge mit einem festen Winkelrotor. Nach der Zentrifugation wurden 23 Fraktionen mit einem Volumen von je $0.352 \mu\text{L}$ von oben nach unten abpipettiert und dann mittels immunologischem Nachweis analysiert.

5.13.2 Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (ELISA)

Der immunologische Antikörpernachweis (ELISA) wurde in schwarzen MaxiSorp-Mikrotiterplatten (96Wells, Nunc, *Thermo Fisher Scientific*) durchgeführt. Hierzu wurden $2 \mu\text{L}$ der einzelnen DGZ-Fraktionen mit $98 \mu\text{L}$ Wasser auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Jede Fraktion wurde in vier Wells pipettiert. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C und 400 rpm. Nach dem Ausklopfen der Platten wurden die Wells mit jeweils $200 \mu\text{L}$ PBS-T (PBS mit 0.2 % TWEEN) für 2 min bei 400 rpm gewaschen. Anschließend wurde der Puffer entfernt und jedes Well mit 0.25-%ige Milchpulverlösung ($100 \mu\text{L/Well}$) für 35 min bei Raumtemperatur

und 400 rpm geschüttelt. Erneut wurden die Wells mit PBS-T gewaschen und es wurde eine 1:5000 Verdünnung des primären Antikörpers 6E10 (*Covance*) 100 µL/ Well aufgetragen. Der primäre Antikörper kann mit der Aminosäuresequenz 1-16 von Aβ ($K_D = 22$ nM für monomeres Aβ, $K_D = 1.4$ nM für Aβ-Fibrillen) interagieren.^[213] Die Platte wurde 2 h bei Raumtemperatur und 400 rpm geschüttelt. Darauffolgend wurde die Platte wieder für 2 min mit PBS-T gewaschen und je 100 µL des zweiten Antikörpers GAM-PO (*Dianova*) (1:6000 Verdünnung) in jedes Well gegeben. Die Inkubationszeit betrug unter Schütteln (400 rpm) 2 h bei Raumtemperatur. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS-T wurden 100 µL einer Entwicklerlösung von QuantaBlu™ Fluorogenic Peroxidase Substrate Kit (*Thermo Scientific*) hinzugegeben, 30 min bei Raumtemperatur und 400 rpm geschüttelt. Zum Beenden der Reaktion wurden 100 µL pro Well Stopplösung aus dem Kit aufgetragen und anschließend die Fluoreszenz gemessen. Das Fluoreszenzsignal wurde mit folgenden Parametern gemessen: Excitationswellenlänge: 330 nm, Emissionswellenlänge 419-421 nm, Schrittweite der Emissionswellenlänge 1, Verstärkung 100, Anzahl der Blitze 50, Integrationszeit 20 µs. Es erfolgte eine Vierfachbestimmung über drei Wellenlängen mit Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung.

5.14 Zellkulturexperimente

Die Zellkulturexperimente wurden von *Andreas Müller-Schiffmann* aus dem Arbeitskreis Korth (Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) nach einem Protokoll von Podlisny *et al.* durchgeführt.^[202] Für diese Experimente wurde zellulär sezerniertes Aβ aus einer CHO-Zelllinie (Hennes20) verwendet, die stabil einen Überschuss an APP752 exprimierten, welches die familiäre APP-Mutante Indiana-Mutation V717F trug. Die Zelllinie generierte Aβ und sekretierte Aβ-Monomere (4 kDa) und große Aβ-Spezies (8.5-12.5 kDa) ins Medium ab. Die Hennes20 Zellen wurden in DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin kultiviert. 5×10^5 Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und nach 2 h wurden die Zellen mit den Liganden, reinen Goldnanopartikeln oder Konjugaten behandelt. Nach vier Tagen wurde das Medium durch serumfreies Medium ersetzt und erneut die Testsubstanzen hinzugegeben. Nach weiteren 72 h Inkubationszeit wurden die Zellen durch Zentrifugation aus dem konditionierten Medium (engl. *conditioned medium*, CM) entfernt (20 000 g für fünf Minuten bei 4 °C). Die Aβ-Spezies wurden aus dem CM über Nacht bei 4 °C mit NHS-sepharosegekoppletem mAB-IC26 (erkennt die Aminosäuresequenz 2-8 von

A β) immunopräzipitiert.^[214] Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Proben elektrophoretisch auf 10-20 % Tricin-Peptidgel (*Biorad*) aufgetrennt und auf eine 0.2 μ M Nitrocellulosemembran (NC Membran, 400 mA für 2 h) überführt. Die Filter wurden für 10 Minuten in PBS gekocht und über Nacht bei 4 °C mit 5 % Magermilch (Oxoid, *Thermo Scientific*) in PBS-T geblockt. Nachdem drei Mal mit PBS-T gewaschen wurde, wurden die Membranen für jeweils 10 Minuten mit monoklonalem 4G8 Antikörper (*Signet*, 1:500-Verdünnung in PBS-T) versetzt. Dieser Antikörper erkennt die Aminosäuresequenz 17-24 des A β -Peptids. Als sekundärer Antikörper wurde ein mit HRP-gekoppeltes (engl. *horseradish peroxidase*) IgG aus der Ziege der Firma *Thermo Scientific* als 1:25 000-Verdünnung in PBS-T und zur Detektion das Amersham ECL Western Blotting Detektionsreagenz der Firma *GE Healthcare Life Science* verwendet. A β -Signale wurden durch Densitometrie mit der Software ImageJ (*National Institutes of Health*) quantifiziert.

Es konnten die hergestellten Liganden, reine Goldnanopartikel und die entsprechenden Konjugate vermessen werden (Endkonzentration: c(Ligand) = 10 μ M, 3 μ M oder 0.1 μ M, c(AuNP) = 50 μ g/mL). Für bifunktionale Konjugate wurden pro Ligand 5 μ M eingesetzt.

Für die Überprüfung der Zellviabilität wurde die APP- und Caspase-3-Expression überprüft. Zum Nachweis des APP und Caspase-3 wurden die Zellen in 750 μ L Lysepuffer (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 % NP40, 5 mM EDTA) gelöst und mit einem Complete protease inhibitor cocktail der Firma *Roche* versetzt. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde durch ein DC-Protein-Detektionskit der Firma *Biorad* ermittelt. Es wurden 30 μ g des Lysates abgenommen, auf einem NuPAGE 4-12 % Bis-Trisgel (*Invitrogen*) aufgetrennt und auf eine 0.2 μ m NC Membran überführt. Auch hier wurden die Zellen mit 5 % Magermilch in PBS-T geblockt und APP und Caspase-3 mit CT15 polyklonalem Antiserum aus dem Kaninchen (1:3500-Verdünnung in TBS-T) und Caspase-3-Antikörper (1:1000-Verdünnung in TBS-T, #9662, *Cell Signaling*) detektiert. Der Nachweis von Tubulin erfolgte mit einem monoklonalen Anti- α -Tubulin-Antikörper (1:15 000-Verdünnung in PBS-T, T9026, *Sigma Aldrich*) und diente als interne Kontrolle. Anschließend wurde mit einer 1:25 000-Verdünnung eines sekundären Ziege-Anti-Maus-Antikörpers (IRDye 680RD) und eines Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörpers (IRDye 800CW) der Firma *LI-COR* inkubiert. Die Signalintensitäten wurden an einem LI-COR Odyssey CLX mit der Software Image Studio Version 2.1 (*LI-COR Biosciences*) ausgewertet.^[179]

5.15 Licht- und Konfokalmikroskopie

Für die Aufnahme der Zellbilder mittels Mikroskop wurden die Zellen (2×10^4) aus den Zellkulturexperimenten auf Objektträger ausgesät und mit den Testsubstanzen behandelt. Nach vier Tagen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4 % *para*-Formaldehyd in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Erneut wurden die Zellen zwei Mal mit PBS und Wasser gewaschen. ProLong Gold mit DAPI (*Invitrogen*) wurde auf die Zellen appliziert und mit einem Lichtmikroskop und verschiedenen DIC-Filtern visualisiert. Die Aufnahmen wurden von *Andreas Müller-Schiffmann* aus dem Arbeitskreis Korth (Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) durchgeführt.

Bei dem Einsatz des Konfokalmikroskops wurden drei Kanäle genutzt: Goldnanopartikel wurden bei 532 nm angeregt (Emission 425 – 510 nm), DAPI-Zellkerne wurden bei 405 nm (Emission 534 – 590 nm) unter Verwendung eines Weißlicht-Lasers angeregt. DIC Filter wurden zur Visualisierung der Zellmembran genutzt. Die Aufnahmen wurden von *Lisa Gamrad* aus dem Arbeitskreis Barcikowski (Technische Chemie, Universität Duisburg-Essen) am Imaging Center Essen (IMCES, Universitätsklinikum Essen) erstellt.^[179]

6 Literaturverzeichnis

- [1] A. Alzheimer, *Allgemeine Zeitschrift fuer Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medicin* **1907**, 64, 146-148.
- [2] A. Alzheimer, *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* **1911**, 1, 356-385.
- [3] J. Lindsay, *American Journal of Epidemiology* **2002**, 156, 5, 445-453.
- [4] Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. *Selbsthilfe Demenz*, <https://www.deutsche-alzheimer.de/> (Stand 24.01.2017).
- [5] *Alzheimer's Disease International* **2017**, <https://www.alz.co.uk/> (Stand 24.01.2017).
- [6] M. Pallas, A. Camins, *Current Pharmaceutical Design* **2006**, 12, 4389-4408.
- [7] D. Avramopoulos, *Genome medicine* **2009**, 1, 3, 34.
- [8] L. Mucke, *Nature* **2009**, 461, 895-897.
- [9] Alzheimer's Association, *Alzheimer's & dementia the journal of the Alzheimer's Association* **2011**, 7, 2, 208-244.
- [10] *A Close Look into the Alzheimer's Brain / Knowing Neurons on WordPress.com*, <https://knowingneurons.wordpress.com/2012/11/21/a-close-look-into-the-alzheimers-brain/> (Stand 24.01.2017).
- [11] M. Morris, S. Maeda, K. Vossel, L. Mucke, *Neuron* **2011**, 70, 3, 410-426.
- [12] E. Chang, S. Kim, K. N. Schafer, J. Kuret, *Biochimica et biophysica acta* **2011**, 1814, 2, 388-395.
- [13] N. Bogdanovic, *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2000**, 4, 304-305.
- [14] C. Haass, M. G. Schlossmacher, A. Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B. L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E. H. Koo, D. Schenk, D. B. Teplow, D. J. Selkoe, *Nature* **1992**, 359, 322-325.
- [15] P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, F. Esch, M. Lee, H. Dovey, D. Davis, S. Sinha, M. G. Schlossmacher, J. Whaley, C. Swindlehurst, R. McCormach, R. Wolfert, D. J. Selkoe, I. Lieberburg, D. Schenk, *Nature* **1992**, 359, 325-327.
- [16] E. Dawkins, D. H. Small, *Journal of neurochemistry* **2014**, 129, 5, 756-769.
- [17] N. N. Nalivaeva, A. J. Turner, *FEBS letters* **2013**, 587, 13, 2046-2054.
- [18] A. B. Clippingdale, J. D. Wade, C. J. Barrow, *Journal of peptide science an official publication of the European Peptide Society* **2001**, 7, 5, 227-249.
- [19] H. Zheng, E. H. Koo, *Molecular neurodegeneration* **2011**, 6, 1, 27.
- [20] R. J. O'Brien, P. C. Wong, *Annual review of neuroscience* **2011**, 34, 185-204.
- [21] M. S. Wolfe, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 13, 2039-2060.
- [22] P. Chiang, M. Lam, Y. Luo, *CMM* **2008**, 8, 6, 580-584.
- [23] D. B. Teplow, *Amyloid* **2009**, 5, 2, 121-142.
- [24] M. P. Murphy, H. 3. LeVine, *Journal of Alzheimer's disease JAD* **2010**, 19, 1, 311-323.
- [25] M. Ahmed, J. Davis, D. Aucoin, T. Sato, S. Ahuja, S. Aimoto, J. I. Elliott, W. E. van Nostrand, S. O. Smith, *Nature structural & molecular biology* **2010**, 17, 5, 561-567.
- [26] N. S. de Groot, F. X. Aviles, J. Vendrell, S. Ventura, *The FEBS journal* **2006**, 273, 3, 658-668.
- [27] A. Rauk, *Chemical Society reviews* **2009**, 38, 9, 2698-2715.
- [28] F. Re, C. Airoidi, C. Zona, M. Masserini, B. La Ferla, N. Quattrocchi, F. Nicotra, *Current Medicinal Chemistry* **2010**, 17, 27, 2990-3006.
- [29] I. W. Hamley, *Chemical reviews* **2012**, 112, 10, 5147-5192.
- [30] O. Crescenzi, S. Tomaselli, R. Guerrini, S. Salvadori, A. M. D'Ursi, P. A. Temussi, D. Picone, *European Journal of Biochemistry* **2002**, 269, 22, 5642-5648.

- [31] *A β -Oligomere - die toxischen Zwischenprodukte des A β -Aggregationsprozesses* **2015**, http://images.slideplayer.org/10/2845659/slides/slide_24.jpg (Stand 27.03.2017).
- [32] V. H. Finder, R. Glockshuber, *Neuro-degenerative diseases* **2007**, 4, 1, 13-27.
- [33] N. D. Lazo, M. A. Grant, M. C. Condon, A. C. Rigby, D. B. Teplow, *Protein science a publication of the Protein Society* **2005**, 14, 6, 1581-1596.
- [34] C. J. Pike, D. Burdick, A. J. Walencewicz, C. G. Glabe, C. W. Cotman, *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience* **1993**, 1676-1687.
- [35] M. Sakono, T. Zako, *The FEBS journal* **2010**, 277, 6, 1348-1358.
- [36] G. M. Shankar, S. Li, T. H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N. E. Shepardson, I. Smith, F. M. Brett, M. A. Farrell, M. J. Rowan, C. A. Lemere, C. M. Regan, D. M. Walsh, B. L. Sabatini, D. J. Selkoe, *Nature medicine* **2008**, 14, 8, 837-842.
- [37] T. Lührs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Döbeli, D. Schubert, R. Riek, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102, 17342-17347.
- [38] J. Hardy, D. Allsop, *Trends in Pharmacological Sciences* **1991**, 12, 383-388.
- [39] J. Hardy, G. A. Higgins, *Science* **1992**, 256, 184-185.
- [40] M. Ingelsson, H. Fukumoto, K. L. Newell, J. H. Growdon, E. T. Hedley-Whyte, M. P. Frosch, M. S. Albert, B. T. Hyman, M. C. Irizarry, *Neurology* **2004**, 62, 6, 925-931.
- [41] D. M. Walsh, I. Klyubin, J. V. Fadeeva, M. J. Rowan and D. J. Selkoe, *Biochemical Society Transactions* **2002**, 30, 552-556.
- [42] Y. Gong, L. Chang, K. L. Viola, P. N. Lacor, M. P. Lambert, C. E. Finch, G. A. Krafft, W. L. Klein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100, 18, 10417-10422.
- [43] J. L. Tomic, A. Pensalfini, E. Head, C. G. Glabe, *Neurobiology of disease* **2009**, 35, 3, 352-358.
- [44] C. Haass, D. J. Selkoe, *Nature reviews. Molecular cell biology* **2007**, 8, 2, 101-112.
- [45] O. Wirths, G. Multhaup, T. A. Bayer, *Journal of neurochemistry* **2004**, 91, 3, 513-520.
- [46] Alzheimer's Association, *Alzheimer's & dementia the journal of the Alzheimer's Association* **2016**, 12, 4, 459-509.
- [47] I. Füsgen, J. Kornhuber, "Frühformen der Demenz - Früherfassung, Risikofaktoren und Prävention bei MCI: Zukunftsforum Demenz", Band 9, **2004**.
- [48] D. Schenk, R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandeventer, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games, P. Seubert, *Nature* **1999**, 400, 173-177.
- [49] D. J. Selkoe, D. Schenk, *Annual review of pharmacology and toxicology* **2003**, 43, 545-584.
- [50] L. Minati, T. Edginton, M. G. Bruzzone, G. Giaccone, *American journal of Alzheimer's disease and other dementias* **2009**, 24, 2, 95-121.
- [51] D. Oehlrich, H. Prokopcova, H. J. M. Gijzen, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2014**, 24, 9, 2033-2045.
- [52] E. Karran, M. Mercken, B. de Strooper, *Nature reviews. Drug discovery* **2011**, 10, 9, 698-712.
- [53] S. S. Sisodia, P. H. St George-Hyslop, *Nature reviews. Neuroscience* **2002**, 3, 4, 281-290.
- [54] M. S. Wolfe, *Neurotherapeutics the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **2008**, 5, 3, 391-398.
- [55] J. Hardy, D. J. Selkoe, *Science* **2002**, 297, 353-356.
- [56] D. M. Walsh, D. J. Selkoe, *Journal of neurochemistry* **2007**, 101, 5, 1172-1184.
- [57] A. R. A. Ladiwala, J. S. Dordick, P. M. Tessier, *The Journal of biological chemistry* **2011**, 286, 5, 3209-3218.

- [58] K. Ono, Y. Yoshiike, A. Takashima, K. Hasegawa, H. Naiki, M. Yamada, *Journal of neurochemistry* **2003**, 87, 1, 172-181.
- [59] K. Ono, K. Hasegawa, Y. Yoshiike, A. Takashima, M. Yamada, H. Naiki, *Journal of neurochemistry* **2002**, 81, 3, 434-440.
- [60] K. Ono, K. Hasegawa, H. Naiki, M. Yamada, *Biochimica et biophysica acta* **2004**, 1690, 3, 193-202.
- [61] G. Yamin, K. Ono, M. Inayathullah, D. Teplow, *CPD* **2008**, 14, 30, 3231-3246.
- [62] T. Hamaguchi, K. Ono, A. Murase, M. Yamada, *The American journal of pathology* **2009**, 175, 6, 2557-2565.
- [63] P. Vlieghe, V. Lisowski, J. Martinez, M. Khrestchatisky, *Drug discovery today* **2010**, 15, 1-2, 40-56.
- [64] L. O. Tjernberg, J. Naslund, F. Lindqvist, J. Johansson, A. R. Karlstrom, J. Thyberg, L. Terenius, C. Nordstedt, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271, 15, 8545-8548.
- [65] D. J. Gordon, R. Tappe, S. C. Meredith, *Journal of Peptide Research* **2002**, 60, 37-55.
- [66] C. Soto, E. M. Sigurdsson, L. Morelli, R. A. Kumar, E. N. Castano, B. Fragione, *Nature medicine* **1998**, 4, 822-826.
- [67] T. Schumacher, L. M. Mayr, D. L. Minor Jr, M. A. Milhollen, M. W. Burgess, P. S. Kim, *Science* **1996**, 271, 1854-1857.
- [68] K. Wiesehan, D. Willbold, *Chembiochem a European journal of chemical biology* **2003**, 4, 9, 811-815.
- [69] K. Wiesehan, K. Buder, R. P. Linke, S. Patt, M. Stoldt, E. Unger, B. Schmitt, E. Bucci, D. Willbold, *Chembiochem a European journal of chemical biology* **2003**, 4, 8, 748-753.
- [70] K. Wiesehan, J. Stohr, L. Nagel-Steger, T. van Groen, D. Riesner, D. Willbold, *Protein engineering, design & selection PEDS* **2008**, 21, 4, 241-246.
- [71] K. Wiesehan, "Identifizierung und Charakterisierung eines spezifischen Liganden für das Alzheimer Amyloid- β -Peptid ($A\beta$)", Berichte des Forschungszentrums Jülich **2003**.
- [72] D. Willbold, S. A. Funke, O. Brener, L. Nagel-Steger, D. Bartnik, Polymere, enthaltend multivalente amyloid-beta-bindende d-peptide und deren verwendung **2013**, Patent WO2013150127 A2.
- [73] D. Bartnik, S. A. Funke, L.-C. Andrei-Selmer, M. Bacher, R. Dodel, D. Willbold, *Rejuvenation research* **2010**, 13, 2-3, 202-205.
- [74] T. van Groen, K. Wiesehan, S. A. Funke, I. Kadish, L. Nagel-Steger, D. Willbold, *ChemMedChem* **2008**, 3, 12, 1848-1852.
- [75] O. O. Olubiyi, B. Strodel, *The journal of physical chemistry. B* **2012**, 116, 10, 3280-3291.
- [76] T. Schrader, C. Kirsten, *Chemical Communication* **1996**, 2089-2090.
- [77] C. N. Kirsten, T. H. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 50, 12061-12068.
- [78] Y. Lu, H.-B. Kraatz, *Inorganica Chimica Acta* **2004**, 357, 1, 159-166.
- [79] P. Saweczko, G. D. Enright, H.-B. Kraatz, *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 17, 4409-4419.
- [80] M. Hellmert, A. Muller-Schiffmann, M. S. Peters, C. Korth, T. Schrader, *Organic & biomolecular chemistry* **2015**, 13, 10, 2974-2979.
- [81] P. Rzepecki "Neue β -Faltblattliganden zur Hemmung der Aggregation des Amyloid- β -Peptids", Dissertation **2004**.
- [82] P. Rzepecki, L. Nagel-Steger, S. Feuerstein, U. Linne, O. Molt, R. Zadnarm, K. Aschermann, M. Wehner, T. Schrader, D. Riesner, *The Journal of biological chemistry* **2004**, 279, 46, 47497-47505.
- [83] K. Hochdörffer "Oligomere Aminopyrazole gegen die pathologische Aggregation des Alzheimer-Peptids", Dissertation **2009**.
- [84] L. Nagel-Steger, B. Demeler, W. Meyer-Zaika, K. Hochdörffer, T. Schrader, D. Willbold, *European biophysics journal EBJ* **2010**, 39, 3, 415-422.

- [85] T. Schrader, D. Riesner, L. Nagel-Steger, F. Biesemeier, K. Hochdörffer, Trimere, wasserlösliche Aminopyrazolverbindungen mit Wirkung gegen neurodegenerative Erkrankungen **2006**, Patent WO2007112922 A1.
- [86] J. März-Berberich "Aminopyrazol-Hybridverbindungen gegen Aggregation und Neurotoxizität des Alzheimer-Peptids" Dissertation **2010**.
- [87] A. Müller-Schiffmann, J. März-Berberich, A. Andreyeva, R. Röncke, D. Bartnik, O. Brener, J. Kutzsche, A. H. C. Horn, M. Hellmert, J. Polkowska, K. Gottmann, K. G. Reymann, S. A. Funke, L. Nagel-Steger, C. Moriscot, G. Schoehn, H. Sticht, D. Willbold, T. Schrader, C. Korth, *Angewandte Chemie* **2010**, 122, 46, 8925-8928.
- [88] K. Hochdörffer, J. März-Berberich, L. Nagel-Steger, M. Eppe, W. Meyer-Zaika, A. H. C. Horn, H. Sticht, S. Sinha, G. Bitan, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 12, 4348-4358.
- [89] S. Dornieden, A. Müller-Schiffmann, H. Sticht, N. Jiang, Y. Cinar, M. Wordehoff, C. Korth, S. A. Funke, D. Willbold, *PLoS one* **2013**, 8, 3, e59820.
- [90] M. Hellmert "Hochentwickelte Aminopyrazol-Hybride gegen pathologische Prozesse der Alzheimer-Krankheit", Dissertation **2014**.
- [91] K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B. J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart, I. L. Medintz, *Chemical reviews* **2013**, 113, 3, 1904-2074.
- [92] J. A. Blackman, *Elsevier* **2008**.
- [93] M.-C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 293-346.
- [94] *Web of Science [v.5.23] - Result Analysis "gold nanoparticles"*, <http://wcs.webofknowledge.com/RA/analyze.do> (Stand 13.02.2017).
- [95] M. Zahmakiran, S. Ozkar, *Nanoscale* **2011**, 3, 9, 3462-3481.
- [96] M. Faraday, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **1857**, 147, 145-181.
- [97] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *J. Disc. Faraday Soc.* **1951**, 11, 55-75.
- [98] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, A. Plech, *The journal of physical chemistry. B* **2006**, 110, 32, 15700-15707.
- [99] G. Frens, *Nature physical science* **1973**, 241, 20-22.
- [100] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, R. Whyman, *Chemical Communication* **1994**, 7, 801-802.
- [101] O. Stamatoiu, J. Mirzaei, X. Feng, T. Hegmann, *Topics in current chemistry* **2012**, 318, 331-393.
- [102] R. R. Arvizo, S. Bhattacharyya, R. A. Kudgus, K. Giri, R. Bhattacharya, P. Mukherjee, *Chemical Society reviews* **2012**, 41, 7, 2943-2970.
- [103] "Standard Gold Nanoparticles - Cytodiagnostics", <http://www.cytodiagnostics.com/store/pc/Standard-Gold-Nanoparticles-c140.htm> (Stand 13.02.2017).
- [104] Y. Xia, Y. Xiong, B. Lim, S. E. Skrabalak, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2009**, 48, 1, 60-103.
- [105] C. J. Murphy, T. K. Sau, A. M. Gole, C. J. Orendorff, J. Gao, L. Gou, S. E. Hunyadi, T. Li, *The journal of physical chemistry. B* **2005**, 109, 29, 13857-13870.
- [106] J. Neddersen, G. Chumanov, T. M. Cotton, *Applied Spectroscopy* **1993**, 47, 1959-1964.
- [107] A. Hahn, S. Barcikowski, B. N. Chichkov, *JLMN* **2008**, 3, 2, 73-77.
- [108] V. Amendola, M. Meneghetti, *Physical chemistry chemical physics PCCP* **2009**, 11, 20, 3805-3821.
- [109] "Laser-Generated Functional Nanoparticles and Materials: Principle and pictures from the process of pulsed laser ablation in liquids". **2017**, <https://www.uni-due.de/barcikowski/fothem1.htm> (Stand 14.02.2017).
- [110] S. Barcikowski, A. Hahn, A. V. Kabashin, B. N. Chichkov, *Appl. Phys. A* **2007**, 87, 1, 47-55.
- [111] C. Rehbock, J. Jakobi, L. Gamrad, S. van der Meer, D. Tiedemann, U. Taylor, W. Kues, D. Rath, S. Barcikowski, *Beilstein journal of nanotechnology* **2014**, 5, 1523-1541.

- [112] G. Bajaj, R. K. Soni, *Appl. Phys. A* **2009**, 97, 2, 481-487.
- [113] A. N. Shipway, M. Lahav, R. Gabai, I. Willner, *Langmuir* **2000**, 16, 23, 8789-8795.
- [114] A. Barchanski, U. Taylor, S. Klein, S. Petersen, D. Rath, S. Barcikowski, *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* **2011**, 46 Suppl 3, 42-52.
- [115] N. K. Mishra (Ed.), *Catalytic Application of Nano-Gold Catalysts: Supported Gold Nanoparticles as Promising Catalysts*, InTech **2016**.
- [116] T. L. Doane, C.-H. Chuang, R. J. Hill, C. Burda, *Accounts of chemical research* **2012**, 45, 3, 317-326.
- [117] J.-P. Sylvestre, A. V. Kabashin, E. Sacher, M. Meunier, J. H. T. Luong, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 23, 7176-7177.
- [118] R. A. Alvarez-Puebla, E. Arceo, P. J. G. Goulet, J. J. Garrido, R. F. Aroca, *The journal of physical chemistry. B* **2005**, 109, 9, 3787-3792.
- [119] L. Gamrad, C. Rehbock, J. Krawinkel, B. Tumursukh, A. Heisterkamp, S. Barcikowski, *J. Phys. Chem. C* **2014**, 118, 19, 10302-10313.
- [120] R. Greenwood, *Advances in Colloid and Interface Science* **2003**, 106, 1-3, 55-81.
- [121] J.-P. Sylvestre, S. Poulin, A. V. Kabashin, E. Sacher, M. Meunier, J. H. T. Luong, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 16864-16869.
- [122] H. Muto, K. Yamada, K. Miyajima, F. Mafuné, *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, 46, 17221-17226.
- [123] S. Petersen, S. Barcikowski, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, 19, 8, 1167-1172.
- [124] X. Yang, M. Yang, B. Pang, M. Vara, Y. Xia, *Chemical reviews* **2015**, 115, 19, 10410-10488.
- [125] F. Aldeek, M. A. H. Muhammed, G. Palui, N. Zhan, H. Mattoussi, *ACS nano* **2013**, 7, 3, 2509-2521.
- [126] M. J. Hostetler, A. C. Templeton, R. W. Murray, *Langmuir* **1999**, 15, 11, 3782-3789.
- [127] M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, R. Baxter, G. Teobaldi, F. Zerbetto, *Langmuir* **2003**, 19, 12, 5172-5174.
- [128] K. S. Mayya, F. Caruso, *Langmuir* **2003**, 19, 6987-6993.
- [129] J.-W. Park, J. S. Shumaker-Parry, *ACS nano* **2015**, 9, 2, 1665-1682.
- [130] N. R. Panyala, E. M. Pena-Mendez, J. J. Havel, *Journal of applied biomedicine* **2009**, 7, 75-91.
- [131] S. Petersen, A. Barchanski, U. Taylor, S. Klein, D. Rath, S. Barcikowski, *J. Phys. Chem. C* **2011**, 115, 12, 5152-5159.
- [132] N. Lewinski, V. Colvin, R. Dreze, *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2008**, 4, 1, 26-49.
- [133] C. M. Goodman, C. D. McCusker, T. Yilmaz, V. M. Rotello, *Bioconjugate chemistry* **2004**, 15, 4, 897-900.
- [134] Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U. Simon, G. Schmid, W. Brandau, W. Jahnen-Dechent, *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2007**, 3, 11, 1941-1949.
- [135] M. Semmler-Behnke, W. G. Kreyling, J. Lipka, S. Fertsch, A. Wenk, S. Takenaka, G. Schmid, W. Brandau, *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2008**, 4, 12, 2108-2111.
- [136] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 3, 668-677.
- [137] S. Link, M. A. El-Sayed, *International Reviews in Physical Chemistry* **2000**, 19, 3, 409-453.
- [138] P. N. Njoki, I.-I. S. Lim, D. Mott, H.-Y. Park, B. Khan, S. Mishra, R. Sujakumar, J. Luo, C.-J. Zhong, *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, 40, 14664-14669.
- [139] A. M. Alkilany, C. J. Murphy, *Journal of nanoparticle research an interdisciplinary forum for nanoscale science and technology* **2010**, 12, 7, 2313-2333.

- [140] Kyung A Kang, Jianting Wang, Jacek B Jasinski, Samuel Achilefu, *Journal of Nanobiotechnology* **2011**, 9, 16, 1-13.
- [141] E. Dulkeith, M. Ringler, T. A. Klar, J. Feldmann, A. Munoz Javier, W. J. Parak, *Nano letters* **2005**, 5, 4, 585-589.
- [142] U. H. F. Bunz, V. M. Rotello, *Angewandte Chemie* **2010**, 122, 19, 3338-3350.
- [143] P. Tiwari, K. Vig, V. Dennis, S. Singh, *Nanomaterials* **2011**, 1, 1, 31-63.
- [144] N. Sanvicens, M. P. Marco, *Trends in biotechnology* **2008**, 26, 8, 425-433.
- [145] E. Boisselier, D. Astruc, *Chemical Society reviews* **2009**, 38, 6, 1759-1782.
- [146] H. J. Johnston, G. Hutchison, F. M. Christensen, S. Peters, S. Hankin, V. Stone, *Critical reviews in toxicology* **2010**, 40, 4, 328-346.
- [147] Y.-F. Huang, Y.-W. Lin, Z.-H. Lin, H.-T. Chang, *J Nanopart Res* **2009**, 11, 4, 775-783.
- [148] L. A. Dykman, N. G. Khlebtsov, *ACTA Naturae* **2011**, 3, 34-55.
- [149] G. Han, P. Ghosh, M. De, V. M. Rotello, *Nanobiotechnol* **2007**, 3, 1, 40-45.
- [150] M.-C. Bowman, T. E. Ballard, C. J. Ackerson, D. L. Feldheim, D. M. Margolis, C. Melander, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 22, 6896-6897.
- [151] B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, W. C. W. Chan, *Nano letters* **2006**, 6, 4, 662-668.
- [152] W. Jiang, B. Y. S. Kim, J. T. Rutka, W. C. W. Chan, *Nature nanotechnology* **2008**, 3, 3, 145-150.
- [153] P.-H. Yang, X. Sun, J.-F. Chiu, H. Sun, Q.-Y. He, *Bioconjugate chemistry* **2005**, 16, 3, 494-496.
- [154] G. Maiorano, S. Sabella, B. Sorce, V. Brunetti, M. A. Malvindi, R. Cingolani, P. P. Pompa, *ACS nano* **2010**, 4, 12, 7481-7491.
- [155] F. Re, M. Gregori, M. Masserini, *Maturitas* **2012**, 73, 1, 45-51.
- [156] W. M. Pardridge, *Molecular interventions* **2003**, 3, 90-105.
- [157] W. H. de Jong, W. I. Hagens, P. Krystek, M. C. Burger, A. J. A. M. Sips, R. E. Geertsma, *Biomaterials* **2008**, 29, 12, 1912-1919.
- [158] N. Khlebtsov, L. Dykman, *Chemical Society reviews* **2011**, 40, 3, 1647-1671.
- [159] G. Sonavane, K. Tomoda, K. Makino, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2008**, 66, 2, 274-280.
- [160] C. Saraiva, C. Praca, R. Ferreira, T. Santos, L. Ferreira, L. Bernardino, *Journal of the Controlled Release Society* **2016**, 235, 34-47.
- [161] P. Ghosh, G. Han, M. De, C. K. Kim, V. M. Rotello, *Advanced drug delivery reviews* **2008**, 60, 11, 1307-1315.
- [162] R. M. Koffie, C. T. Farrar, L.-J. Saidi, C. M. William, B. T. Hyman, T. L. Spires-Jones, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, 108, 46, 18837-18842.
- [163] M. Zhang, X. Mao, Y. Yu, C.-X. Wang, Y.-L. Yang, C. Wang, *Advanced materials* **2013**, 25, 28, 3780-3801.
- [164] K. A. Moore, K. M. Pate, D. D. Soto-Ortega, S. Lohse, N. van der Munnik, M. Lim, K. S. Jackson, V. D. Lyles, L. Jones, N. Glassgow, V. M. Napumecheno, S. Mobley, M. J. Uline, R. Mahtab, C. J. Murphy, M. A. Moss, *Journal of biological engineering* **2017**, 11, 5.
- [165] M. Zaman, E. Ahmad, A. Qadeer, G. Rabbani, R. H. Khan, *International journal of nanomedicine* **2014**, 9, 899-912.
- [166] Y. Kim, J.-H. Park, H. Lee, J.-M. Nam, *Scientific reports* **2016**, 6, 19548.
- [167] Y.-H. Liao, Y.-J. Chang, Y. Yoshiike, Y.-C. Chang, Y.-R. Chen, *Small* **2012**, 8, 23, 3631-3639.
- [168] E. Araya, I. Olmedo, N. G. Bastus, S. Guerrero, V. F. Puentes, E. Giralt, M. J. Kogan, *Nanoscale Res Lett* **2008**, 3, 11, 435-443.
- [169] I. Olmedo, E. Araya, F. Sanz, E. Medina, J. Arbiol, P. Toledo, A. Alvarez-Lueje, E. Giralt, M. J. Kogan, *Bioconjugate chemistry* **2008**, 19, 6, 1154-1163.

- [170] N. Xiong, X.-Y. Dong, J. Zheng, F.-F. Liu, Y. Sun, *ACS applied materials & interfaces* **2015**, 7, 10, 5650-5662.
- [171] M. J. Kogan, N. G. Bastus, R. Amigo, D. Grillo-Bosch, E. Araya, A. Turiel, A. Labarta, E. Giralt, V. F. Puentes, *Nano letters* **2006**, 6, 1, 110-115.
- [172] N. Gao, H. Sun, K. Dong, J. Ren, X. Qu, *Chemistry* **2015**, 21, 2, 829-835.
- [173] R. Prades, S. Guerrero, E. Araya, C. Molina, E. Salas, E. Zurita, J. Selva, G. Egea, C. Lopez-Iglesias, M. Teixido, M. J. Kogan, E. Giralt, *Biomaterials* **2012**, 33, 29, 7194-7205.
- [174] S. Petersen, S. Barcikowski, *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113, 46, 19830-19835.
- [175] C. Rehbock, V. Merk, L. Gamrad, R. Streubel, S. Barcikowski, *Physical chemistry chemical physics PCCP* **2013**, 15, 9, 3057-3067.
- [176] P. C. Patel, D. A. Giljohann, D. S. Seferos, C. A. Mirkin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, 105, 45, 17222-17226.
- [177] A. Müller-Schiffmann, H. Sticht, C. Korth, *Biodrugs* **2012**, 26, 21-31.
- [178] C. Streich "Laser-Synthesized Bioconjugated Noble Metal Nanoparticles - Rational Design and Efficacy against Pathological Protein Aggregation", Dissertation **2017**.
- [179] C. Streich, L. Akkari, C. Decker, J. Bormann, C. Rehbock, A. Muller-Schiffmann, F. C. Niemeyer, L. Nagel-Steger, D. Willbold, B. Sacca, C. Korth, T. Schrader, S. Barcikowski, *ACS nano* **2016**, 10, 8, 7582-7597.
- [180] V. Merk, C. Rehbock, F. Becker, U. Hagemann, H. Nienhaus, S. Barcikowski, *Langmuir the ACS journal of surfaces and colloids* **2014**, 30, 15, 4213-4222.
- [181] W. T. Nichols, T. Sasaki, N. Koshizaki, *J. Appl. Phys.* **2006**, 100, 11, 114913.
- [182] S. Mirsadeghi, R. Dinarvand, M. H. Ghahremani, M. R. Hormozi-Nezhad, Z. Mahmoudi, M. J. Hajipour, F. Atyabi, M. Ghavami, M. Mahmoudi, *Nanoscale* **2015**, 7, 11, 5004-5013.
- [183] S. H. D. P. Lacerda, J. J. Park, C. Meuse, D. Pristinski, M. L. Becker, A. Karim, J. F. Douglas, *ACS nano* **2010**, 4, 1, 365-379.
- [184] H. LeVine, *Amyloid* **1995**, 2, 1-6.
- [185] D. J. Lindberg, M. S. Wranne, M. Gilbert Gatty, F. Westerlund, E. K. Esbjorner, *Biochemical and biophysical research communications* **2015**, 458, 2, 418-423.
- [186] M. Biancalana, S. Koide, *Biochimica et biophysica acta* **2010**, 1804, 7, 1405-1412.
- [187] H. 3. LeVine, *Amyloid the international journal of experimental and clinical investigation the official journal of the International Society of Amyloidosis* **2005**, 12, 1, 5-14.
- [188] H. LeVine, *Methods Enzymol.* **1999**, 309, 274-284.
- [189] M. G. Zagorski, J. Yang, H. Shao, K. Ma, H. Zeng, A. Hong, *Methods Enzymol.* **1999**, 309, 189-204.
- [190] M. Bartolini, M. Naldi, J. Fiori, F. Valle, F. Biscarini, D. V. Nicolau, V. Andrisano, *Analytical biochemistry* **2011**, 414, 2, 215-225.
- [191] A. Assarsson, E. Hellstrand, C. Cabaleiro-Lago, S. Linse, *ACS chemical neuroscience* **2014**, 5, 4, 266-274.
- [192] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, *Biochimica et biophysica acta* **2005**, 1751, 2, 119-139.
- [193] X. Wu, G. Narsimhan, *Langmuir the ACS journal of surfaces and colloids* **2008**, 24, 9, 4989-4998.
- [194] V. I. Doderio, Z. B. Quirolo, M. A. Sequeira, *Front Biosci* **2011**, 70, 61-73.
- [195] D. Rugar, P. Hansma, *Physics Today* **1990**, 23-30.
- [196] "Research on Biological Atomic Force Microscopy- How does the AFM work?", <http://web.physics.ucsb.edu/~hhansma/biomolecules.htm> (Stand 27.03.2017).
- [197] W. B. Stine, JR, K. N. Dahlgren, G. A. Krafft, M. J. LaDu, *The Journal of biological chemistry* **2003**, 278, 13, 11612-11622.
- [198] D. B. Williams, C. B. Carter, *Springer Science* **1996**.

- [199] Institut für Biochemie und Pathobiochemie Ruhr-Universität Bochum, "Praktikumsskript für Mediziner - Immunologie: Biochemische Grundlagen", <https://www.ruhr-uni-bochum.de/biochem/mam/content/mediziner/immunologie.pdf> (Stand 14.02.2017).
- [200] S. H. Brewer, W. R. Glomm, M. C. Johnson, M. K. Knag, S. Franzen, *Langmuir the ACS journal of surfaces and colloids* **2005**, 21, 20, 9303-9307.
- [201] S. Dominguez-Medina, J. Blankenburg, J. Olson, C. F. Landes, S. Link, *ACS sustainable chemistry & engineering* **2013**, 1, 7, 833-842.
- [202] M. B. Podlisny, B. L. Ostaszewski, S. L. Squazzo, E. H. Koo, R. E. Rydell, D. B. Teplow, D. J. Selkoe, *Journal of Biological Chemistry* **1995**, 270, 9564-9570.
- [203] A. T. Welzel, J. E. Maggio, G. M. Shankar, D. E. Walker, B. L. Ostaszewski, S. Li, I. Klyubin, M. J. Rowan, P. Seubert, D. M. Walsh, D. J. Selkoe, *Biochemistry* **2014**, 53, 24, 3908-3921.
- [204] S. W. Paddock, *BioTechniques* **1999**, 27, 992-1004.
- [205] S. W. Paddock, "Atlas of Oral Microbiology: Principles and Practices of Laser Scanning Confocal Microscopy by Stephen W. Paddock", *Elsevier* **2015**, 15-40.
- [206] F. Chiti, C. M. Dobson, *Annual review of biochemistry* **2006**, 75, 333-366.
- [207] L. Nagel-Steger, O. Brener, L. Gremer, D. Willbold, Verfahren zur quantitativen Charakterisierung amyloider Peptide und/oder Proteine in einer Probe **2013**, Patent DE102013011634 A1.
- [208] S. Roux, B. Garcia, J.-L. Bridot, M. Salomé, C. Marquette, L. Lemelle, P. Gillet, L. Blum, P. Perriat, O. Tillement, *Langmuir the ACS journal of surfaces and colloids* **2005**, 21, 6, 2526-2536.
- [209] J. Suh, *Asian Journal of Organic Chemistry* **2014**, 3, 1, 18-32.
- [210] J. Suh, S. H. Yoo, M. G. Kim, K. Jeong, J. Y. Ahn, M.-s. Kim, P. S. Chae, T. Y. Lee, J. Lee, J. Lee, Y. A. Jang, E. H. Ko, *Angewandte Chemie (International Ed.)* **2007**, 46, 37, 7064-7067.
- [211] W. S. Chei, H. Ju, J. Suh, *Journal of biological inorganic chemistry JBIC a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **2011**, 16, 3, 511-519.
- [212] M. Di Carlo, D. Giacomazza, P. L. San Biagio, *Journal of physics. Condensed matter an Institute of Physics journal* **2012**, 24, 244102.
- [213] M. Ramakrishnan, K. K. Kandimalla, T. M. Wengenack, K. G. Howell, J. F. Poduslo, *Biochemistry* **2009**, 48, 43, 10405-10415.
- [214] A. Müller-Schiffmann, A. Herring, L. Abdel-Hafiz, A. N. Chepkova, S. Schable, D. Wedel, A. H. C. Horn, H. Sticht, Souza Silva, M. A. de, K. Gottmann, O. A. Sergeeva, J. P. Huston, K. Keyvani, C. Korth, *Brain a journal of neurology* **2016**, 139, 509-525.

LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

